

Biochemische Untersuchungen an den
eukaryotischen Initiationsfaktoren

4A/4G

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorlegt von

Swantje Heidi Borowski

aus Karl-Marx-Stadt

Köln 2015

Berichterstatter: Prof. Dr. Ulrich Baumann
Prof. Dr. Ines Neundorf

Köln, 26.06.2015

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Baumann möchte ich mich für die Bereitstellung des Themas und die hervorragende Betreuung während der Anfertigung meiner Doktorarbeit bedanken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Neundorf für die Begutachtung der Arbeit bedanken. Bei Prof. Dr. Kay Hofmann bedanke ich mich die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Mein Dank gilt Dr. Jan Gebauer und Dr. Magdalena Schacherl für die freundliche und kollegiale Unterstützung und Messung der CrystalHarp an der Swiss Light Source (Paul Scherrer Institut). Bei Elena Brunstein bedanke ich mich für die Reinigung und die Kristallisationsexperimente des Komplexes eIF4A:eIF4GICD(E1428A/E1430A/E1432A). Monika Gompert danke ich für die Bereitstellung der Kompetenten *E.coli* Zellen. Bei Sandra Wettig bedanke ich mich für die Bereitstellung der Medien und Arbeitsmaterialien. M. Sc. Anna Montada, Dipl. Chem. Sinan Öcal, M. Sc. Christian Pichlo und M. Sc. Anna Köhler danke ich für die vorzügliche Arbeitsatmosphäre und den ergiebigen Austausch.

Bei Herrn Dr. von Kries möchte ich mich für die Möglichkeit, den Assay am FMP messen zu können, bedanken. Des Weiteren richtet sich mein Dank auch an Herrn Andreas Oder für die sehr gute Zusammenarbeit bei der Etablierung des HTR-Assays sowie der Durchführung des HT-Screenings. Ebenfalls danke ich dem Graduiertenprogramm "Pharmacology and Experimental Therapeutics" für das Ermöglichen vielseitiger Weiterbildungen sowie für die Finanzierung.

Ich bedanke mich bei Bastian und meiner Familie für die Unterstützung während des Promotionsstudiums. Zuletzt möchte ich mich bei Lydia bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	vii
Tabellenverzeichnis.....	xiv
Abkürzungsverzeichnis.....	xv
Abstract.....	xviii
Zusammenfassung	xx
1 Translationsinitiation.....	22
1.1 Mechanismus der Cap-abhängigen Translationsinitiation	23
1.1.1 Der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 4A (eIF4A).....	25
1.1.2 Der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 4G (eIF4GI)	26
1.2 Cap-abhängige Translationsinitiation und Krebs	29
1.2.1 Regulation des eIF4F-Komplexes	29
1.2.2 Inhibitoren des eIF4F-Komplexes.....	31
2 Hochdurchsatztaugliche Tests (Assays) in der Medikamentenentwicklung.....	34
2.1 Hochdurchsatz-Screening (HTS)	35
2.1.1 Bestimmung des z-Faktors	36
2.1.2 Hit-Auslese: der Z-Score	37
2.2 Homogener Zeit aufgelöster TR-FRET-Assay.....	38
3 Zielsetzung der Arbeit.....	41
4 Material und Methoden	42
4.1 Material	42
4.1.1 Antikörper	42
4.1.2 Chemikalien.....	42
4.1.3 Enzyme	44
4.1.4 Geräte	44
4.2 Methoden	46
4.2.1 Klonierung	46
4.2.2 Rekombinante Expression von eIF4A und eIF4GI.....	46
4.2.3 Zellaufschluss	47

4.2.4	Affinitätschromatographie	47
4.2.5	Affinitätstagentfernung mittels Thrombin / <i>Human Rhinovirus</i> 3C-Proteasen	48
4.2.6	Gel-Permeations-Chromatographie	49
4.2.7	Konzentrierung der Proteine durch Ultrazentrifugation	49
4.2.8	Kristallisation	49
4.2.9	<i>Differential scanning fluorimetry</i>	52
4.2.10	Aktivitätstest EnzChek® Phosphat Assay Kit	52
4.2.11	Oberflächenentropie-Reduktionsmutanten	53
4.2.12	Bio-Layer-Interferometrie (BLI)	55
4.2.13	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie	56
4.2.14	HTR-FRET-Methode	56
5	Ergebnisse	61
5.1	Komplex-Bildung von eIF4A1:eIF4G1CD(1572)	61
5.1.1	<i>Differential Scanning Fluorimetry</i> (DSF)	62
5.2	Co-Aufreinigung von eIF4A1:eIF4G1CD	65
5.3	Oberflächenentropie-Reduktion	65
5.3.1	Oberflächenentropie-Reduktionsmutanten von eIF4G1CD	65
5.3.2	Oberflächenentropie-Reduktionsmutanten von eIF4A1	67
5.4	Verkürzung von eIF4G1CD	68
5.5	Kristallisation	69
5.5.1	Kristallisation von eIF4A1:eIF4G1CD(1572)	70
5.5.2	Kristallisation mittels <i>CrystalHarp™</i> von eIF4A1:eIF4G1CD(1572)	71
5.5.3	Kristallisation von eIF4A1:eIF4G1CD(1426)	73
5.6	Aktivitätstests	74
5.7	Untersuchung der Interaktion des eIF4A:eIF4G1(1426)	75
5.8	Komplexbildung von eIF4A <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mit eIF4G1CD	76
5.9	Geschlossene Konformation von eIF4A	77
5.9.1	Design der Mutante eIF4A1 (G70C/(R367C)	78
5.9.2	Aufreinigung von eIF4A(G70C/R367C) und Bildung der Disulfidbrücke	79
5.9.3	Komplexbildung von eIF4A(G70C/R367C) mit eIF4G1CD (1426)	81
5.10	Homogener TR-FRET-Assay	83
5.10.1	Homogener TR-FRET von Komplex eIF4A:eIF4G1CD	83
5.10.2	HTR-FRET-Assay von eIF4A-Myc/eIF4G1CD-HA	84
5.10.3	HTR-FRET von eIF4A-Myc/eIF4G1CD-His	86

5.10.4	NaCl-Abhängigkeit von eIF4A:eIF4GICD	88
5.10.5	HTR-FRET-Signalstabilität von eIF4A-Myc:eIF4AGICD-His	90
5.10.6	Spezifität des HTR-FRET-Assays von eIF4A-Myc:eIF4GICD-His	91
5.11	Pilotscreen von HTR-FRET eIF4A-Myc:eIF4GICD-His	93
5.11.1	Primären Screen HTR-FRET eIF4A-Myc:eIF4GICD-His	95
5.11.2	Validierung von eIF4A-Myc:eIF4GICD-His	96
5.12	Zeit aufgelöster FRET von eIF4A:eIF4GMD	97
6	Diskussion	99
6.1	Biochemische Untersuchungen von eIF4A:eIF4GICD	99
6.2	Hochdurchsatzverfahren vom HTR-FRET-Assays eIF4A:eIF4GICD	103
6.3	HTR-FRET-Assay von Komplex eIF4A:eIF4GMD	105
7	Literaturverzeichnis	106
8	Anhang.....	116
8.1	Differential Scanning Fluorimetry von eIF4A:eIF4GICD(1572).....	116
8.2	Oberflächenentropie-Reduktionsmutanten von eIF4GICD	120
8.3	HTR-FRET-Assay eIF4A:eIF4GICD(1426)	121
8.4	Aminosäuresequenz der Konstrukte	123
8.5	Report Primäres HTS-Screening eIF4A-myc:eIF4GICD-His	127
8.5.1	Counterscreen	138
	Erklärung	139
	Lebenslauf	140

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Schema der Cap-abhängigen Translationsinitiation. A: Bildung des 43-S Präinitiationskomplexes, B: Bildung des Ternärkomplexes C: Bildung der eIF4F-Komplexes und Zyklisierung der mRNA, D: Rekrutierung des 43-S Präinitiationskomplexes und Scanning der 5'UTR, F: Formation des aktiven 80 S-Ribosoms. (Abbildung aus [14])	24
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung von eIF4A (geöffnete Konformation). A: Darstellung der konservierten Motive. B: Darstellung der Motive bei deren Funktion mit Einzelstrang (single strand (ss)) RNA, Motiv: Q, I, II VI zuständig für Nukleotid-Bindung und Hydrolyse, Ia, Ib, IV, V Bindung des Substrats (RNA). Das Motiv III spielt beim Separieren der RNA und der Hydrolyse eine Rolle. (Abbildung aus [25])	26
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung von den Isoformen von eIF4G. Die Isoform eIF4GI/eIF4GIII habe die gleiche Aufgabe bei der Translationsinitiation. eIF4GIII enthält nur die HEAT-Domäne von der mittleren Domäne und hift bei der IRES-Translationsinitiation mit [14].	27
Abbildung 1.4: Modell des Interaktionsverlaufs im eIF4F-Komplex, A: eIF4A bindet an eIF4IGCD und wird an die eIF4GMD (B) übertragen.	28
Abbildung 1.5: Regulation des eIF4F-Komplexes durch die mTOR-Signalkaskade. A: PDCD4-Interaktion mit eIF4A B: Interaktion 4E-BP mit eIF4E [41].....	30
Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Funktion des eIF4F-Komplexes in Anwesenheit von A: starker mRNA und B: schwacher mRNA [45].	31
Abbildung 2.1: Schematische Übersicht der Medikamentenentwicklung [66-68].	34
Abbildung 2.2: Die normale Verteilung des Z-Scores eines HT-Screenings	37
Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des HTR-FRET-Tests von Cisbio Assays . Die Detektion der Interaktion verläuft über Antikörper-Bindung an den jeweiligen Epitop-TAG des Proteins (z.B. GST-Tag). Bei der Bildung eines Komplexes kann ein Energie-Transfer stattfinden. Der Donor-Antikörper EU(K)-Cryptate/Tb-Cryptate hat eine Anregungswellenlänge von ca. 330 nm. Die Emissions-Wellenlänge des Donorantikörpers beträgt 620 nm und die des Akzeptorantikörpers 665 nm. Es werden jeweils beide Emissions-Wellenlängen ausgelesen, wodurch der Energie-Transfer berechnet werden kann [75].	39

Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Hook-Effektes. Das Signal/Hintergrund-Verhältnis wird gegen die Konzentration des Analyten aufgetragen. Bei einer Übersättigung der Antikörper ist ein Verlust des Signal/Hintergrund-Verhältnisses erkennbar.	40
Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Enzym-gekoppelten EnzChek® Phosphat-Assay, A: aus eIF4A mit ScRNA entsteht Phosphat und ADP aus ATP. B: Das Substrat 2-Amino-6-mercapto-7-methyl-purin ribosid (MESG) wird in Anwesenheit von Phosphat durch das Enzym Purin-nukleosid-Phosphorylase (PNP) in Ribose-1-Phosphat und 2-amino-6-mercapto-7-Methylpurin ($Abs_{max} = 360 \text{ nm}$) gespalten [79].....	53
Abbildung 4.2: Theoretischer Verlauf einer BLI- Messung	55
Abbildung 5.1: Elutionsprofil: Komplexbildung eIF4A:I:eIF4GICD(1572). Das Elutionsvolumen von 68.7ml entspricht dem Komplex und das Elutionsvolumen von 76 ml entspricht eIF4GICD(1572). SDS Page: Spur 1: Unstained Protein Marker (kDa) Spur2-5 sind die Fraktionen des Elutionsvolumens von 68.7ml eIF4A: M_W von 42kDa, eIF4GICD(1572): M_W von 35kDa.	62
Abbildung 5.2: Darstellung der Schmelzkurven relative Fluoreszenz Unit (RFU 10^3) gegen die Temperatur. Beschreibung: Vergleich der Schmelzkurven von eIF4A, eIF4GICD(1572) und eIF4A:eIF4ICD(1572) im Puffersystem Tris-HCl pH 8)	63
Abbildung 5.3: Elutionsprofil: Komplexbildung eIF4A:I:eIF4GICD(1572). Das Elutionsvolumen von 73.2 ml entspricht dem Komplex und das Elutionsvolumen von 83 ml charakterisiert eIF4A. SDS Page: Spur 1-6 Fraktionen von Elutionsvolumen von 73.2; Spur 7: Unstained Protein Marker (kDa); Spur: 8-11 Fraktionen von Elutionsvolumen von 73.2 ;Spur 1-2: Protein von Elutionsvolumen von 83 ml eIF4A: M_W von 42kDa, eIF4GICD: M_W von 35kDa.....	65
Abbildung 5.4: Schematische Darstellung der Oberflächenentropie-Reduktionsmutanten in der Struktur (PDB 1UG3) von eIF4GICD (1234-1572). Der N-Terminus ist in der Farbe hellblau dargestellt. Der Linker ist nicht strukturiert. Der C-Terminus ist schwarz dargestellt, die Cluster türkis.	66
Abbildung 5.5: Schematische Darstellung der Oberflächenentropie-Reduktionsmutanten in der Struktur (PBD 2ZU6) von eIF4A (20-406). Das gesamte Protein ist dargestellt in Grau, die Clustermutanten sind türkis hervorgehoben.	67

- Abbildung 5.6: Elutionsprofil von der Komplexbildung eIF4A:eIF4GICD(1426). Das Elutionsvolumen von 80 entspricht dem Komplex und das Elutionsvolumen von 91.97ml entspricht eIF4GICD(1426). SDS Page: Spur 1-11 Fraktionen von der Elutionsvolumen von 73.2 ml, Spur 12: Unstained Protein Marker (kDa), Spur 1-3: drei Fraktionen von das Elutionsvolumen von 91.97ml entspricht eIF4GICD(1426). (eIF4A: M_w von 42kDa, eIF4GICD: M_w von 23.4kDa). 68
- Abbildung 5.7: Vergleich des Laufverhaltens von eIF4A, eIF4GICD(1426) und Komplex in der (A) nativen Gelelektrophorese (0,5xTBE Puffer pH 8.3) und (B) SDS-Gelelektrophorese. M_w : eIF4A 43 kDa, eIF4GICD(1426) 23.5 kDa, Komplex eIF4A:eIF4GICD(1426) 70 kDa. Marker: Unstained Protein Markern (kDa) 69
- Abbildung 5.8: Kristallbilder des Komplexes eIF4A:eIF4GICD(1572) und Beugungsmuster. A: 2 % Tacsimat (v/v), 0.1 M HEPES pH 7.0, 20 % (w/v) PEG 3350 B: 8 % Tacsimat (v/v) pH 6.0, 20 % (v/w) PEG 3350 70
- Abbildung 5.9: Kristallbilder des Komplexes eIF4A:eIF4GICD(1572), A: 0.2 M Ammoniumacetat 0.1 M BIS-TRIS, pH 5.5, 25 % (w/v) PEG 3350, B: 0.2M Ammoniumacetat 0.1 M BIS-TRIS, pH 5.5, 25 % (v/w) PEG 3350 mit 0.04 % (v/v) Dichloromethan. 71
- Abbildung 5.10: Kristallbilder in der CrystalHarp™ bei 4°C. A: 0.1 M Ammoniumsulfat 0.1 M Citrate (pH 5.5), 12 % (v/w) PEG 4000; B: 0.1 M Calciumchlorid, 0.1 M MES (pH 6.5) ,15 % (v/w) PEG 4000; C: 0.1M Natriumcacodylat (pH 6.0), 10 % (v/w) MPEG 5000 10 % (v/v) 2-Propanol. 72
- Abbildung 5.11: Kristallbilder in der CrystalHarp™ bei 20°C. A:0.1M Natriumchlorid, 0.1M Natriumcacodylat (pH 6.0), 12 % (v/w) PEG 8000 und Beugungsmuster; B: 0.1 M Magnesiumacetat, 0.1 M MES (pH 6.5), 12 % (v/w) PEG 8000; C: 0.15 M Natriumchlorid, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5), 15 % (v/w) PEG 2000. 72
- Abbildung 5.12: Kristallbilder von Komplex eIF4A:eIF4GICD(1426). A:0.2 M Natriumcitrat, 20 % (w/v) PEG 3350, B: 1 M Natriumcitrat 100 mM Tris (pH 7), 200 mM Natriumchlorid. 73
- Abbildung 5.13: Aktivität von eIF4A , eIF4A:eIF4GI Komplex. eIF4A:eIF4GMD; 2 mM ATP 10 mM $MgCl_2$ Lösung und 0.3 $\mu g/\mu l$ Hefe RNA wurde für alle Ansätze verwendet. Für das Experiment wurden Triplikate durchgeführt, wodurch sich die Fehlerbalken ergaben. 74

- Abbildung 5.14: Diagramm der Inhibierung von eIF4GICD auf eIF4A. 2 mM ATP 10 mM MgCl₂ Lösung und 0.3 µg/µl Hefe RNA wurde für alle Ansätze verwendet. Für das Experiment wurden Triplikate durchgeführt, wodurch sich die Fehlerbalken ergaben..... 75
- Abbildung 5.15: Bindungsdiagramm eIF4AI:eIF4GICD(1426). (Bindungsdiagramm: schwarz: 1250 nM eIF4A, lila: 600 nM eIF4A, blau: 300 nM eIF4A, grün: 150 nM eIF4A, rot: 100 nM eIF4A, gelb: 75 nM eIF4A)..... 76
- Abbildung 5.16: Elutionsprofil von der Komplex-Bildung ScElF4AI:eIF4GICD(1426) Das Elutionsvolumen von 80.6 ml entspricht ScElF4AI und das Elutionsvolumen von 89.8 ml entspricht eIF4GICD(1426). SDS Page: Spur 1: Unstained Protein Marker (kDa), Spur 2-5 sind die Fraktionen des Elutionsvolumen von 80.63 ml, Spur 6-9 sind die Fraktionen von Elutionsvolumen von 89 ml ScElF4AI: MW von 45 kDa, eIF4GICD: MW von 35 kDa. 77
- Abbildung 5.17: Strukturelle Darstellung von Cystein-Mutanten von eIF4AI. In Grau ist das Homologiemodell (eIF4AIII (PDB 2J0Q)) dargestellt und in Magenta sind die beiden Aminosäure Glycin und Arginin dargestellt. Der Abstand wurde von dem Cα-Atomen bestimmt und beträgt 4.85 Å..... 79
- Abbildung 5.18: SDS-Gel-Analyse zur Bildung der Disulfidbrücke von der eIF4A(G70C/R367C). A: 12 % SDS-Gel: Spur 1: Rohlysate, Spur 2: Durchlauf, Spur 3: Wasch I, Spur 4: Wasch II, Spur 5: Elution I, Spur 6: Unstained Protein Marker (kDa); Spur 7: nicht reduzierte Elution I; B: 10 % SDS-Gel: Spur 1: nicht reduzierte Elution nach einem Tag, Spur 2: Elution, Spur 3: Unstained Protein Marker (kDa) eIF4A(G70C/R367C): MW von 45 kDa, 80
- Abbildung 5.19: Vergleich des Laufverhaltens von eIF4A(G70C/R367C) mit eIF4A, A: Elutionsprofil von eIF4A(G70C/R367C), Elutionsvolumen von 88 ml; B: Elutionsprofil von eIF4A Elutionsvolumen von 79 ml..... 81
- Abbildung 5.20: Elutionsprofil der Komplexbildung eIF4AI(G70C/R367C):eIF4GICD(1426). Das Elutionsvolumen von 88 ml entspricht eIF4AI(G70C/R367C): und das Elutionsvolumen von 92 ml entspricht eIF4GICD(1426). SDS Gel: Spur 1-7 sind Fraktionen von Elutionsvolumen 88 ml, Spur 8: Unstained Protein Marker (kDa), Spur 9-12 Fraktionen von Elutionsvolumen 92.9 ml, ScElF4AI: M_w:45 kDa, eIF4GICD: M_w:25kDa. (Puffer: 100 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,5)..... 82

- Abbildung 5.21: Bindungsdiagramm von eIF4GICD(1426) (10 μ M) mit 1.25 μ M eIF4A(G70C/R367C), Grüne Bindungskurve: 1.25 μ M eIF4A(G70C/R367C) mit 4 mM DTT (1:1Fit), Violette Bindungskurve: 1.25 μ M eIF4A(G70C/R367C) ohne DTT..... 83
- Abbildung 5.22: Darstellung der HTR-FRET-Daten von eIF4AI-Myc:eIF4GICD-HA. In den Konzentrationen 10-1000 nM mit den Antikörpern Eu(K)-HA und XL665-Myc im Puffer 100 mM NaCl, 100 mM KF, 50 mM Hepes pH 7,5, 0.01 % Tween, 0.05 % BSA; A: Titration von eIF4A-Myc gegen eIF4GICD-HA, in den Konzentrationen 10-1000 nM, S/B-Verhältnis gegen die Konzentration 10-1000 nM eIF4A-Myc aufgetragen. B: Kompetitiver Assay: 500 nM von eIF4A-Myc/eIF4GICD-HA inhibiert mit in den Konzentrationen von 5-2500 nM eIF4GICD-His. C: 500 nM von eIF4A-Myc/eIF4GICD-HA versetzt mit den 1,25-6,25 % DMSO-Toleranz des Assays..... 85
- Abbildung 5.23: Darstellung der Titration-Daten von eIF4A-Myc gegen eIF4GICD-HA in den Konzentrationen von 15.6-500 nM mit den Antikörpern Tb-HA und XL665-Myc im Puffer: 150 mM NaCl, 50 mM Hepes pH 7.5, 0,01 % Tween 20, 0,05 % BSA..... 86
- Abbildung 5.24: Darstellung der Titrationsdaten von eIF4A-Myc gegen eIF4GICD-His in den Konzentrationen 7.8-500 nM mit den Antikörpern Tb-His und XL665-Myc im Assay-Puffer 150 mM NaCl, 50 mM Hepes, pH 7,5, 0,01 % (v/v) Tween 20, 0,05 % (w/v) BSA. 87
- Abbildung 5.25: Darstellung der Natriumchlorid-Titrationsdaten von eIF4A-Myc/eIF4GICD-His mit den Antikörpern Tb-His und XL665-Myc im Puffer: 50 mM Hepes pH 7,5, 0,01 % (v/v) Tween, 0,05 (w/v) %, BSA. A: HTR-FRET-Verhältnis (R) gegen die finale Natriumchlorid-Konzentration [mM]. B: S/B-Verhältnis gegen die finale Natriumchlorid-Konzentration [mM]. 87
- Abbildung 5.26: Bindungsdiagramm von eIF4A:eIF4GICD(1426) mit 30 mM NaCl (Bindungsdiagramm: grün: 24 nM eIF4A-Myc, violett: 12 nM eIF4A-Myc, gelb: 6nM eIF4A-Myc, blau: 3nM eIF4A-Myc) 88
- Abbildung 5.27: Bindungsdiagramm eIF4A:eIF4GICD(1426) mit 150 mM NaCl (Bindungsdiagramm: grün: 24 nM eIF4A-Myc, violett: 12 nM eIF4A-Myc, gelb: 6nM eIF4A-Myc, blau: 3nM eIF4A-Myc) 89
- Abbildung 5.28: Darstellung der Signalstabilität des HTR-FRETs von eIF4A-Myc:eIF4GICD-His. A: Das HTR-FRET-Verhältnis (R) gegen die Zeit ohne Zugabe/mit 1 mM DTT. B: Relative

Fluoreszenzeinheit (RFU) des Akzeptors XL665 gegen die Zeit ohne Zugabe/mit 1 mM DTT.....	90
Abbildung 5.29: Darstellung der Titrationsdaten von eIF4A-Myc gegen eIF4GICD-His in den Konzentrationen 3.9-250 nM mit den Antikörpern Tb-His und XL665-Myc im Puffer 30 mM NaCl, 50 mM Hepes pH 7.5, 0.01 % (v/v) Tween 20, 0.1 % (w/v) BSA 1mM DTT.	91
Abbildung 5.30: Kompetitiver Assay: 31.2 nM von eIF4A-Myc/eIF4GICD-His inhibiert mit verschiedenen Konzentrationen eIF4GICD-HA.	92
Abbildung 5.31: Kompetitiver Assay von eIF4A(G60C/R367C): 31.2 nM von eIF4A-Myc/eIF4GICD-HA inhibiert mit verschiedenen Konzentrationen eIF4-Cys (eIF4A(G60C/R367C)).	93
Abbildung 5.32: Klebrigkeitstest von eIF4A-Myc/eIF4GICD-His mit verschiedenen Dispenser-Tips. blau: eIF4A-Myc/eIF4GICD-His ohne BSA, orange: eIF4A-Myc/eIF4GICD-His inkubiert mit Dispenser-Tips, braun: eIF4A-Myc/eIF4GICD-His inkubiert mit Dispenser-Tips, die mit BSA beschichtet sind. violett: eIF4A-Myc/eIF4GICD-His inkubiert mit Dispenser-Tips, die mit BSA beschichtet sind und 0.1 % BSA im Reaktionspuffer.....	94
Abbildung 5.33: Diagramm von Z-Score der Donor-Fluoreszenz gegen Z-Score der Akzeptor-Fluoreszenz (Rote Punkte sind alle Messwerte des gesamten Screenings).....	95
Abbildung 5.34: Verteilung der Z-Scores von 16.544 gemessenen Proben. Lila gibt die Verteilung der Messdaten und die gepunktet Linie die Normalverteilung der Z-Scores an	96
Abbildung 5.35: IC50 Bestimmung und chemische Struktur von 1-[(1R)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl]-N-[[2(trifluoromethyl)phenyl]methyl]methanamin mittels des HTFRET-Assays.....	97
Abbildung 5.36: Darstellung der Daten von HTR-FRET von eIF4AI-His:eIF4GIMD-GST mit den Antikörpern Eu(K) -His und XL665-GST im Puffer: 100 mM KF, 50 mM Hepes pH 7.5, 0.01 % Tween, 0.05 % BSA. A: Titration von eIF4A-Myc gegen eIF4GICD-HA, Signal/Rausch Verhältnis gegen die eIF4A-Myc [nM] B: Kompetitiver Assay: 50 nM von eIF4A-Myc/eIF4GIMD-GST inhibiert mit verschiedenen Konzentrationen eIF4GMD, C: DMSO-Toleranz des HTR-FRET-Assays.	98

Abbildung 8.1: Darstellung der Schmelzkurven von eIF4A:eIF4GICD(1572). Die Relative Fluoreszenz-Einheit (RFU 10^3) ist gegen die Temperatur aufgetragen. Puffersysteme: A: Hepes pH 7,5; B: Phosphat pH 7,0 C: Tris pH 8.5.....	117
Abbildung 8.2: Darstellung der Schmelzkurven von eIF4A:eIF4GICD(1572). Die Relative Fluoreszenz-Einheit (RFU 10^3) ist gegen die Temperatur aufgetragen. Puffersysteme: A: Hepes pH 7,5 100 mM NaCl; B: Phosphat pH 7,0, 100 mM NaCl	118
Abbildung 8.3: Darstellung der Schmelzkurven von eIF4A:eIF4GICD(1572). Die Relative Fluoreszenz-Einheit (RFU 10^3) ist gegen die Temperatur aufgetragen. Puffersysteme: C: Tris pH 8.0, 100 mM NaCl; D: Tris pH 8.5, 100 mM NaCl.	119
Abbildung 8.4: Darstellung der Schmelzkurven von eIF4A:eIF4GICD(1572) mit AMP-PNP und Hefe RNA. Die Relative Fluoreszenz-Einheit (RFU 10^3) ist gegen die Temperatur aufgetragen. Puffersysteme: Phosphat pH 7,0; Hepes pH 7,5; Tris pH 8,0; Tris pH 8,5.	119
Abbildung 8.5: Darstellung der Schmelzkurven von eIF4A. Die Relative Fluoreszenz-Einheit (RFU 10^3) ist gegen die Temperatur aufgetragen. Puffersysteme: Phosphat pH 7,0, 500 mM NaCl; Hepes pH 7,5, 500 mM NaCl ; Tris pH 8,0, 500 mM NaCl; Tris pH 8,5, 500 mM NaCl.	120
Abbildung 8.6: Darstellung des Elutionsprofils und SDS Gel-Analyse von E1428A/E1430A/E1432A und E1519A/K1521T/E1522A, das Elutionsvolumen beträgt 73 ml, 12 % SDS Gel: Spur 1 und Spur 9: Unstain Protein Marker; Spur 1-8: Fraktionen des Elutionsvolumens.....	120
Abbildung 8.7: SDS Gel-Analyse der Aufreinigung des Ni-Chelat-Affinitäts-Chromatographie. A: 12 % SDS Page : Spur 1: Rohlysate, Spur 2: Durchlauf, Spur 3: Waschpuffer (10 mM Imidazol) Spur 4: Waschpuffer II (10 mM Imidazol); Spur 5: Waschpuffer III (30 mM Imidazol), Spur 6: Elution I, Spur 7 : Elution 2. Spur 8 Unstain Protein Marker Fermentas B: Spur 1: Rohlysate, Spur 2: Durchlauf, Spur 3: Waschpuffer (10 mM Imidazol) Spur 4: Waschpuffer II (10 mM Imidazol); Spur 5: Waschpuffer III (30 mM Imidazol), Spur 6: Elution I, Spur 7 : Elution 2. Spur 8 Unstain Protein Marker.....	121
Abbildung 8.8: Darstellung der Titration-Daten von eIF4A-Myc/eIF4GICD-His mit den Antikörpern Tb-His und XL665-Myc im Puffer: 50 mM Hepes pH 7.5. A: Signal/Hintergrund Verhältnis gegen die finale Tween [v/v %]. B: Signal/Hintergrund-Verhältnis gegen die finale BSA [v/w %].	121

Abbildung 8.9: Darstellung der Signalstabilität des HTR-FRETs von eIF4A-Myc:eIF4GICD-His.

A: Signalabnahme des HTR-FRET-Verhältnisses (R) gegen die Zeit ohne Zugabe/ mit 1 mM PMSF. B: Abnahme der relative Fluoreszenz Unit (RFU) von XL665 gegen die Zeit ohne Zugabe/ mit 1 mM PMSF. 122

Abbildung 8.10: Counterscreen von 1-[(1R)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl]-N-[[2(trifluoromethyl) phenyl]methyl] methanamin..... 138

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Therapeutika von Anti-eIF4F-Komplex und deren Entwicklungsstufen. 33

Tabelle 4.1: Verwendete Antikörper 42

Tabelle 4.2: Verwendete Chemikalien 42

Tabelle 4.3: Verwendete Enzym 44

Tabelle 4.4: Verwendete Geräte..... 44

Tabelle 4.5 Kristallisationsscreen..... 50

Tabelle 4.6: Cyro-Bedingungen..... 50

Tabelle 4.7: Lister der Primer für die Reduktionsmutanten-PCR..... 54

Tabelle 4.8: Pipettierschema für die Titration 57

Tabelle 5.1 : Schmelztemperatur in Puffer mit 0 mM Natriumchlorid 63

Tabelle 5.2: Schmelztemperatur verschiedener Puffer mit 100 mM Natriumchlorid 64

Tabelle 5.3: K_D -Werte aus dem 1:1-Fit..... 76

Tabelle 5.4: Daten aus dem Fit 1:1 mit 30 mM NaCl. 89

Tabelle 5.5: Daten aus den Fit 1:1 in Buffer mit 150 mM NaCl..... 89

Abkürzungsverzeichnis

4E-BP	eIF4E-bindende Proteine (<i>4E-binding proteins</i>)
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AMP-PNP	Adenosine 5'-(β,γ -imido)triphosphat
AKT	Serin/-Threonine-Proteinkinasen
BLI	Bio-Layer-Interferometrie
BSA	Rinderalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CTD/CD	C-terminale Domäne
DEAD	Aminosäuresequenz: Aspartat (D), Glutamat (E), Alanin (A), Aspartat (D)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
EtOH	Ethanol
Eu	Europium
EJC	<i>Exon Junction Complex</i>
FRET	Förster-Resonanz-Energie-Transfer oder Fluoreszenz- Resonanzen-Energie-Transfer
g	Erdbeschleunigung
GST	Glutathion-S-Transferasen
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin des Influenzavirus A
HEAT	Huntington-Elongation-A subunit-TOR
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
His-Tag	Polyhistidin-Tag (His ₆ -TAG)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
IRES	Interne Ribosomale Eintrittstellen (<i>internal ribosomal entry</i>)

	<i>site</i>)
kDa	Kilodalton
k_a	Assoziation
K_D	Dissoziationskonstante
k_D	Dissoziation
LB	Luria Bertani
mAu	Absorptionseinheit (milli <i>Absorption Unit</i> bei 280 nm)
MD	Mittlere Domäne
mM	Millimolar
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
Myc	Myelocytomatose
μM	Mikro Mol/Liter
Ni-NTA	Nickel-Nitriloessigsäure-Matrix
nM	Nano Mol/Liter
nm	Nanometer
NTD	N-terminale Domäne
PABP	poly(A)-bindendes Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDB	Protein-Daten-Bank
PDCD4	<i>Programmed Cell Death Protein</i>
PEG	Polyethylenglycol
pH	negativer dekadischer Logarithmus (log) der Wasserstoffionen-Aktivität
PI3K	Phosphatidylinositid-3-kinase
Prä-mRNA	Prä-Messenger-RNA
RFU	Relative Fluoreszenzeinheit (<i>Relative Fluorescence Unit</i>)
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumlaurylsulfat (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
Tb	Terbium

TCA	Trichlor-Essigsäure (<i>Trichloroacetic Acid</i>)
TCE	2,2,2-Trichlorethanol
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TCEP	Tris(2-carboxyethyl) phosphin
TRF	<i>Time-Resolved Fluorescence</i>
HTR-FRET	Homogenous Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
UTR	nicht kodierender Bereich (<i>Untranslated Region</i>)
%	Prozent
°C	Grad Celsius
Å	Angström

Abstract

The translation initiation factors eIF4A and eIF4G form, together with the cap-binding protein eIF4E, the eIF4F complex, which is crucial for both recruiting the small ribosomal subunit 40 S to the 5'-untranslated regions of the mRNAs and for the subsequent scanning process. The eIF4A complex is an ATP-dependent RNA helicase whose activity is stimulated by binding to eIF4G. In mammals, this scaffold protein has two binding motifs for eIF4A, one of which is located on the eIF4G middle domain (eIF4GMD) and acts as an activator upon helicase activity. The other binding motif is found in the C-terminal domain (eIF4GCD) with a regulatory mode upon activity in order to co-ordinate the shuttling of eIF4A to the middle domain (eIF4GMD). So-called weak mRNAs, which possess long and highly structured 5'-untranslated regions present in many crucial regulatory messages, e.g. ODC or VEGF, are over-proportionally translated upon up-regulation of the eIF4F complex, which therefore represents a potential target for the development of anti-cancer chemotherapeutics. In this context, one aim of this thesis was the discovery of small drug-like molecules that inhibit complex formations between eIF4G and eIF4A. To this end, a high-throughput suitable HTR-FRET (Homogenous Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer, Cisbio Bioassays) assay was developed and applied to screen a library of 16544 compounds. As a result, 252 potential target compounds were identified after screen validation, 1 of which showed IC₅₀ value lower than 10 μ M. Further, the interface properties of the complex between eIF4A and eIF4G were investigated. In order to obtain a closer understanding of the inhibitory influence of eIF4GCD on eIF4A activity and of the atomic characteristics of the eIF4A:eIF4GCD interface, crystallisation of the eIF4GCD:eIF4A complex was examined in detail. Crystals were obtained by the counter diffusion method, but these crystals did not show any diffraction at the SLS (Swiss Light Source, Paul Scherrer Institute, Villigen Switzerland). Therefore, surface entropy reduction mutations were introduced to remove clusters of flexible amino acids of eIF4GCD. Though all of these cluster mutants show a similar binding affinity to eIF4A compared to the wild type, they failed to form any crystals in the present study. Since most of the flexible regions were located in the C-terminal part of eIF4GCD, a truncated construct was generated (eIF4GICD(1426)), which still binds to eIF4A. Biolayer interferometry (BLI) experiments were conducted, and the K_D of eIF4GICD(1426):eIF4A was estimated to about 198nM. Sitting drop crystallisation experiments using this truncated protein in complex with eIF4A did yield crystals that, however, lacked suitable diffraction properties. The crystals were morphologically improved by seeding but the quality of the diffraction at the SLS was still insufficient for revealing the crystal structure. It is well known that eIF4A possesses a very flexible C-terminal domain; therefore surface entropy reduction attempts were employed here as well. Because eIF4A is very much conserved, finding suitable candidate mutants present in other members of the DEAD Box helicases family was difficult. All generated variants became insoluble when expressed in *E. coli*. To remove flexibility in eIF4A, an S-S-crosslink was designed to ensure a closed conformation of the two RecA-like domains of eIF4A. To this end, in eIF4A, the

residues Gly-70 (walker A motif) and Arg-367 (arginine finger) were mutated to cysteines supposed to form a disulfide bridge under oxidative conditions and thus to lock the N- and C-terminal RecA domains in the closed conformation. The success of this approach could be confirmed via SDS Page analysis. Using BLI studies, it could be further demonstrated that the closed conformation of eIF4A had lost its binding to eIF4GCD, but that it could be restored to wild-type levels by adding the reducing agent DTT. This finding implies that by complex formation, eIF4GCD arrests eIF4A in the open conformation and that it therefore might well interact with both RecA-like domains: N-terminal and C-terminal. Indeed, gel filtration and BLI experiments confirmed the requirement for both eIF4A domains to bind to eIF4GCD. This result may be the molecular reason for the modulation of eIF4A activity and translation initiation.

In future studies, candidate compounds identified in the FRET screen should be further validated, chemically developed for affinity, and crystallized with eIF4A or eIF4GCD, depending on to which component they bind more tightly.

Zusammenfassung

Die Translationsinitiation untersteht einer engen Kontrolle, wofür die eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIF) verantwortlich sind. Ein sehr wichtiger Schritt bei der Translationsinitiation ist die Bildung des eIF4F-Komplexes; dieser besteht aus der ATP-abhängigen RNA-Helikase eIF4A und dem Ankerprotein eIF4G sowie dem Cap bindenden Protein eIF4E. Dieser gesamte Komplex ist verantwortlich für die Rekrutierung der 40-S ribosomalen Untereinheit an den 5'-nicht-kodierenden Bereich der mRNAs und den daran anschließenden Scanningprozess. Die Aktivität von eIF4A wird durch die Bindung an eIF4G reguliert. In Säugetieren weist eIF4G zwei bindende Motive auf, wovon eins in der mittleren Domäne (eIF4GMD) lokalisiert ist und einen aktivierenden Effekt auf die Aktivität von eIF4A hat. Das andere findet sich in der C-terminalen Domäne (eIF4GICD), hat einen regulatorischen Effekt auf die Aktivität und dient der Übergabe von eIF4A an die mittlere Domäne eIF4GMD. Sogenannte schwache mRNAs verfügen über lange und stark strukturierte 5'-nicht-kodierende Bereiche, die bei vielen zentralen regulatorischen mRNAs, z.B. der Ornithindecaboxylase (OCD) oder dem Endothelwachstumsfaktor (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) vorkommen. Diese mRNAs sind unter gewissen Bedingungen hochreguliert und bewirken damit ebenso eine Hochregulierung des eIF4F-Komplexes. Aus diesem Grund ist der eIF4F-Komplex ein potenziell interessantes Ziel für die Entwicklung neuer Anti-Krebs-Medikamente. Ein Ziel dieser Arbeit ist daher die Entdeckung einer bioaktiven Substanz, welche die Komplexbildung zwischen eIF4A und eIF4G inhibieren könnte. Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit ein HTR-FRET-Test (Homogenous Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer, *Cisbio Bioassay*) entwickelt. Eine Bibliothek von 16544 Substanzen wurde mit diesem Test durchsucht, von denen 252 Substanzen identifiziert wurden; nach der Validierung wiesen einer davon einen IC50-Wert geringer als 10 μ M auf.

Zentraler Bestandteil des Gerüsts dieser Arbeit ist weiter die Untersuchung der Eigenschaften der Interaktionsfläche von eIF4A und eIF4G. Für ein besseres Verständnis der inhibierenden Wirkungsweise von eIF4GICD auf die eIF4A-Aktivität und der atomaren Grundlagen der Wechselwirkung von eIF4A und eIF4GICD war ein Ziel dieser Arbeit die Kristallisierung des eIF4A:eIF4GICD-Komplexes. Kristalle wurden mittels der *Counter Diffusion*-Methode erhalten, erzeugten jedoch kein Beugungsmuster an der SLS (*Swiss Light Source*, Paul Scherrer Institut). Aus diesem Grund wurde die Methode der Oberflächenentropie-Reduktionsmutanten eingeführt, um Cluster von flexiblen Aminosäuren von eIF4GICD zu entfernen. Obwohl sämtliche Cluster generell dasselbe Bindungsverhalten an eIF4A wie der Wildtyp zeigen, bildeten sich in der vorliegenden Untersuchung jedoch keine Kristalle. Die meisten flexiblen Regionen befinden sich in dem C-terminalen Teil von eIF4GICD, weswegen ein verkürztes Konstrukt hergestellt wurde (eIF4GICD(1426)). Bio-Layer-Interferometrie (BLI) wurde durchgeführt, und es wurde ein K_D von 300nM für den Komplex eIF4A:eIF4GICD(1426) ermittelt. Weiter wurden sogenannte *Sitting-Drop*-Kristallisations-Experimente mit dem verkürzten Protein im Komplex mit eIF4A

durchgeführt; die gebildeten Kristalle ergaben jedoch keine nutzbaren Diffraktionseigenschaften. Diese Kristalle wurden zwar durch *Seeding* verbessert, was aber die Qualität der SLS-Diffraktion nicht dahingehend verbesserte, dass eine Struktur hätte dargestellt werden können. Es ist bekannt, dass eIF4A zwei durch einen *Linker* miteinander flexibel verbundene Domänen hat, weswegen hierzu auch die Oberflächenentropie-Reduktions-Mutanten hergestellt wurden. Alle Varianten wurden jedoch unlöslich in *E. coli* exprimiert. Um die Flexibilität von eIF4A zu entfernen, wurde ein *S-S-Crosslink* konstruiert, um die beiden RecA-ähnlichen Domänen in einer geschlossenen Konformation zu fixieren. Zu diesem Zweck wurden die Aminosäuren Gly-70 (Walker A-Motiv) und Arg-367 (Arginin-Finger) zu Cysteinen mutiert, welche unter oxidativen Bedingungen eine Disulfidbrücke bilden sollten. Diese Annahme konnte durch SDS-Gel-Analyse bestätigt werden. Durch erneute BLI-Studien konnte gezeigt werden, dass die geschlossene Konformation von eIF4A die Bindung zu eIF4GCD verloren hatte. Durch die Zugabe des Reduktionsreagenz DTT konnte jedoch die Bindung vollständig wiederhergestellt werden. Aus diesem Ergebnis kann geschlossen werden, dass bei der Komplexbildung eIF4A durch eIF4GICD in der geöffneten Konformation arretiert wird. Eine Interaktion von eIF4GICD mit beiden N- und C-terminalen Domänen von eIF4A wäre also durchaus denkbar. Diese Ergebnisse könnten den molekularen Grund für den regulatorischen Effekt auf die Aktivität von eIF4A und der Translationsinitiation beschreiben. Zukünftige Studien sollten die erhaltenen Substanzen aus dem HTR-FRET-Test näher untersuchen, in Hinblick auf die Affinität chemisch verbessern und mit eIF4A oder eIF4GCD kristallisieren, abhängig davon, an welcher Komponente die Substanz enger bindet.

1 Translationsinitiation

Die Proteinbiosynthese stellt einen der wichtigsten Prozesse in der Zelle dar. Sie unterteilt sich in Transkription und Translation. Bei der Transkription wird die DNA im Zellkern in die prä-Messenger-RNA (mRNA) transkribiert. Anschließend erfolgt die post-transkriptionelle Modifikation, die Spleißen, *Capping* und Polyadenylierung der prä-mRNA umfasst, was auch als Prozessierung der mRNA bezeichnet wird [1]

Beim Spleißen werden mit Hilfe des Spleißosoms die nicht-kodierten Introns aus der prä-mRNA herausgeschnitten, um alle Exons nahtlos aneinanderzufügen [2]. Gleichzeitig wird das *Capping* durchgeführt; hierbei wird die 5'-Cap-Struktur gebildet, die aus 7'-Methylguanosin besteht, welches über eine 5'-5'-Triphosphat-Brücke mit der mRNA verbunden ist [3]. Die 5'-Cap-Struktur dient zum Schutz vor Exonukleasen [4].

Bei der Polyadenylierung wird an das 3'-Ende der mRNA Polyadenosin mittels der Poly(A)-Polymerase synthetisiert [5]. Die gereifte mRNA besitzt am 5'- und 3'-Ende einen nicht-kodierenden Bereich (*5'-untranslated region*, 5'-UTR bzw. 3'-UTR). Der mittlere Bereich ist der offene Leserahmen, welcher für das Protein kodiert. Die gereifte mRNA wird über die Kernpore in das Cytosol transportiert [6].

Im Cytosol läuft die Translation ab; diese ist eingeteilt in Initiation, Elongation und Termination. Bei Eukaryoten ist das Ziel der Translationsinitiation die Rekrutierung der 40 S-ribosomalen Untereinheit an die gereifte mRNA sowie die Zusammensetzung des 80 S-Ribosoms aus der kleinen 40 S-Untereinheit und der großen 60 S-Untereinheit. Bei der Elongation wird die mRNA in 5'- zu 3'-Richtung dekodiert, um die Polypeptidkette aus Aminosäuren zu synthetisieren. Die Termination hat die Aufgabe des Entlassens der Polypeptidkette; danach erfolgt das Recycling des Ribosoms [7].

Die Translationsinitiation untersteht einer engen Kontrolle, wofür die eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIF) verantwortlich zeichnen. Zwei Mechanismen laufen während der Rekrutierung der 40 S-ribosomalen Untereinheit an die mRNA ab. Der erste Weg ist die Cap-abhängige Initiation: hier erfolgt die Hauptinteraktion über den eukaryotischen Initiationsfaktor 4E (eIF4E) mit der 5'-Cap-Struktur [8]. Dieser Weg wird überwiegend (> 90 %) bei der Translation genutzt.

Der zweite Mechanismus läuft über „Interne Ribosomale Eintrittstellen“ (IRES), die eine spezifische Faltung der mRNA darstellen; der weitere Ablauf erfolgt wie in der Cap-abhängigen Translationsinitiation [9]. Der Weg über die IRES wird für eine geringe Zahl von mRNA oder als eine Antwort auf Stress in der Zelle genutzt [10].

1.1 Mechanismus der Cap-abhängigen Translationsinitiation

Die meisten Proteine werden über den Cap-abhängigen Translationsinitiations-Mechanismus übersetzt. Die kleine 40 S-ribosomale Untereinheit wird aus einem Pool von Ribosomen durch die Bindung von eIF1, eIF1A und eIF3 befreit. Der Initiationsfaktor eIF1 bindet in der E(Exit)-seite, und eIF1A bindet in der A (Aminoacyl)-Seite der 40 S-Untereinheit (Abbildung 1.1A) [11].

Der Ternärkomplex wird gebildet, indem eIF2(GTP) mit dem Initiator Met-tRNA_i^{Met} beladen wird (Abbildung 1.1B). In dem Komplex aus der 40 S-ribosomalen Untereinheit mit eIF3 und eIF1A bindet der Ternärkomplex in der P(Peptidyl)-Seite der 40 S-Untereinheit; dieser große Komplex wird auch 43 S-Präinitiationskomplex genannt [7].

Einer der am stärksten regulierten Schritte in diesem Mechanismus ist die Bildung des heterotrimeren eIF4F-Komplexes (Abbildung 1.1C). Dieser Komplex besteht aus dem Cap-bindenden Protein eIF4E, das an die Cap-Struktur der mRNA bindet, der ATP-abhängigen RNA-Helikase eIF4A und dem Multidomänen-Ankerprotein eIF4G, das Bindungsstellen für alle Proteine aus dem eIF4F-Komplex enthält. Das Ankerprotein besitzt zusätzlich ein Bindungsmotiv für das Poly-A-Bindungsprotein (PABP), das den Prozess der Zyklisierung der mRNA unterstützt [12].

Die Rekrutierung des 43 S-Präinitiationskomplexes verläuft durch die Interaktion von eIF3 mit dem Ankerprotein eIF4G. Anschließend wird der 5'-nicht-kodierende Bereich (5'UTR) der mRNA, auch *Leader-Sequenz* genannt, unter ATP-Verbrauch von eIF4A gescannt, bis das erste Start-Codon gefunden wurde. Dieser Komplex wird auch als 48 S-Initiationskomplex bezeichnet (Abbildung 1.1D) [7].

Die Erkennung des Startcodons AUG löst eine Hydrolyse des Guanosintriphosphats (GTP) von eIF2 aus, was den Zerfall des 48 S-Initiationskomplexes einleitet. Danach erfolgt die Rekrutierung der 60 S-ribosomalen Untereinheit zu der kleinen Untereinheit, und es resultiert das aktive 80 S-Ribosom auf dem Startcodon, das nun für den Beginn der Proteinbiosynthese (Abbildung 1.1F) bereit ist [13].

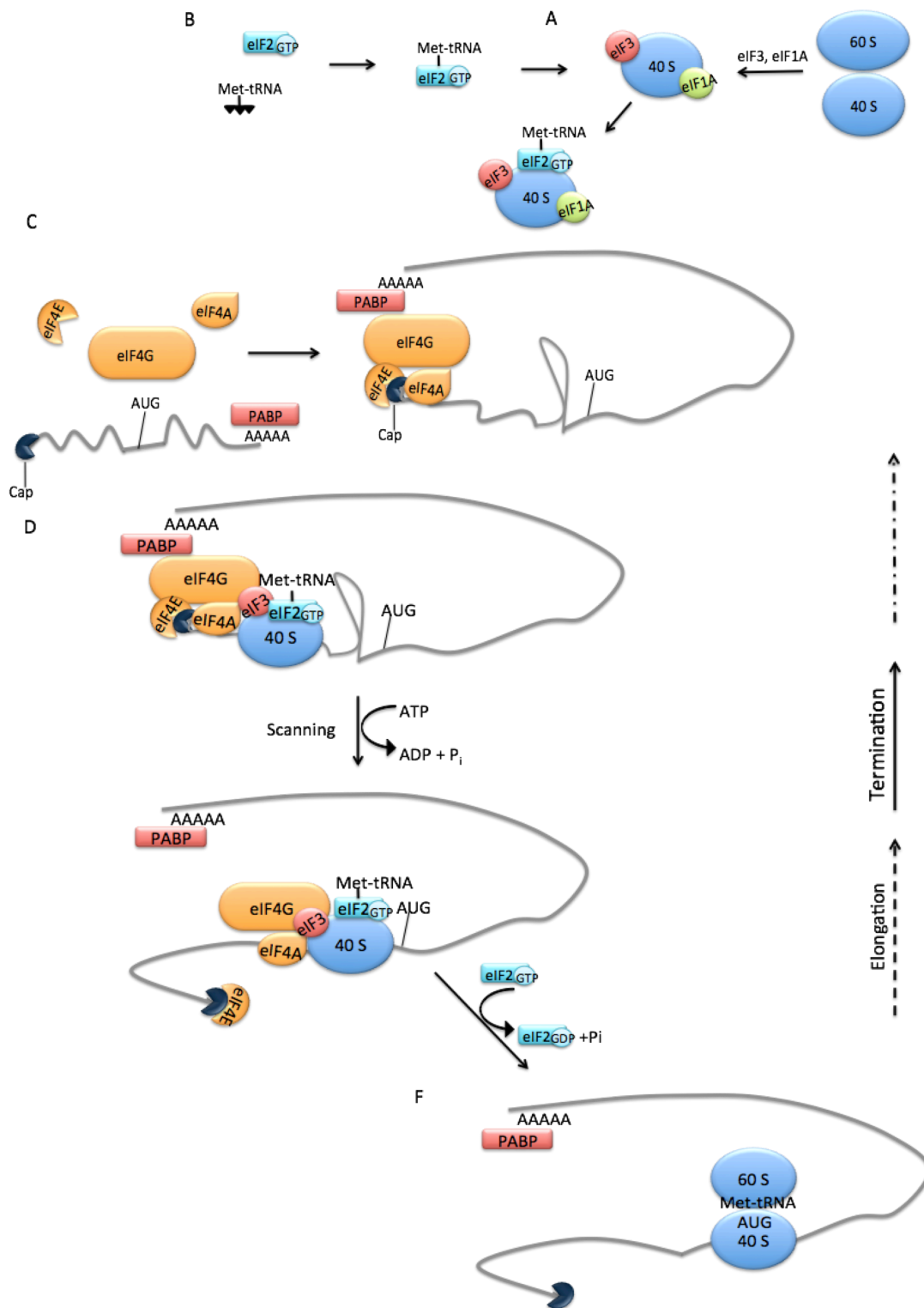


Abbildung 1.1: Schema der Cap-abhängigen Translationsinitiation. A: Bildung des 43-S Präinitiationskomplexes, B: Bildung des Ternärkomplexes C: Bildung der eIF4F-Komplexes und Zyklisierung der mRNA, D: Rekrutierung des 43-S Präinitiationskomplexes und Scanning der 5'UTR, F: Formation des aktiven 80 S-Ribosoms. (Abbildung aus [14])

1.1.1 Der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 4A (eIF4A)

Helikasen wie z.B. die Translationsinitiationsfaktoren sind Motorproteine, die doppelsträngige DNA/mRNA mittels der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) separieren oder umorganisieren. Die Helikasen werden in vier Superfamilien unterteilt. Die DEAD-Box-Helikasen gehören zur Superfamilie 2 (SF2) [15].

Der Prototyp dieser DEAD-Box-Helikasen ist eIF4A, es besteht aus dem konservierten Helikasekern mit ca. 400 Aminosäuren. Die dreidimensionale Struktur von eIF4A besteht aus zwei α/β -Domänen, die beide ähnlich zu dem Protein RecA sind und daher als RecA-Domänen bezeichnet werden. Diese zwei Domänen sind über einen flexiblen *Linker* miteinander verbunden (Abb. 1.2) [16]. Andere DEAD-Box-Helikasen haben Verlängerungen an dem C- und/oder N-Terminus, die regulatorische Effekte ausüben. Bei eIF4A übernehmen andere Proteine diese regulatorischen Aufgaben.

Linder et al. [17] entdeckten im Jahr 1989 das Motiv II, das als Namensgeber für die DEAD (Aminosäuresequenz: Aspartat, Glutamat, Alanin, Aspartat) -Box-Helikase fungiert und für die Hydrolyse des ATP verantwortlich ist. Die Motive Q, I (auch bekannt als Walker A-Motiv), II (bekannt als Walker B-Motiv) und VI sind an der Nukleotid-Bindung und Hydrolyse beteiligt. Das Walker A-Motiv vermittelt die Bindung an die α - und β -Phosphatgruppen des ATPs [18]. Das Motiv VI ist ein Arginin-reiches Motiv, welches als sogenannter Arginin-Finger die γ -Phosphatgruppe kontaktiert und mit seiner positiven Ladung den negativ-geladenen Übergangszustand der Hydrolysereaktion stabilisiert [19].

Die folgenden Motive sind direkt für die Bindung und Aufwindung der mRNA verantwortlich: Ia, Ib, IV und V [20]. Motiv III wiederum fungiert als Verbindungsstelle zwischen der Bindung/Hydrolyse von ATP sowie der Bindung/Separierung der RNA [21].

In *Homo sapiens* finden sich drei Isoformen von eIF4A. Sowohl eIF4AI als auch II haben eine Sequenzidentität von 98 %, und ihre Funktion ist im Cap-abhängigen Translationsinitiations-Mechanismus. Im Gegensatz dazu hat eIF4AIII eine Sequenzidentität zu eIF4AI von nur 65 %; eIF4AIII hilft im *Exon Junction Complex* (EJC) beim Spleißen und beim Abbau von sogenannter *nonsense* mRNA, um eine Verhinderung der Expression von verkürzten Proteinen zu bewerkstelligen [22].

Die erste Struktur des EJC wurde von Bono et al. [23] gelöst. Die Röntgenstruktur des Kerns desjenigen EJC, der an eIF4AIII mit RNA gebunden ist, wurde von Andersen et al. [24] gelöst.

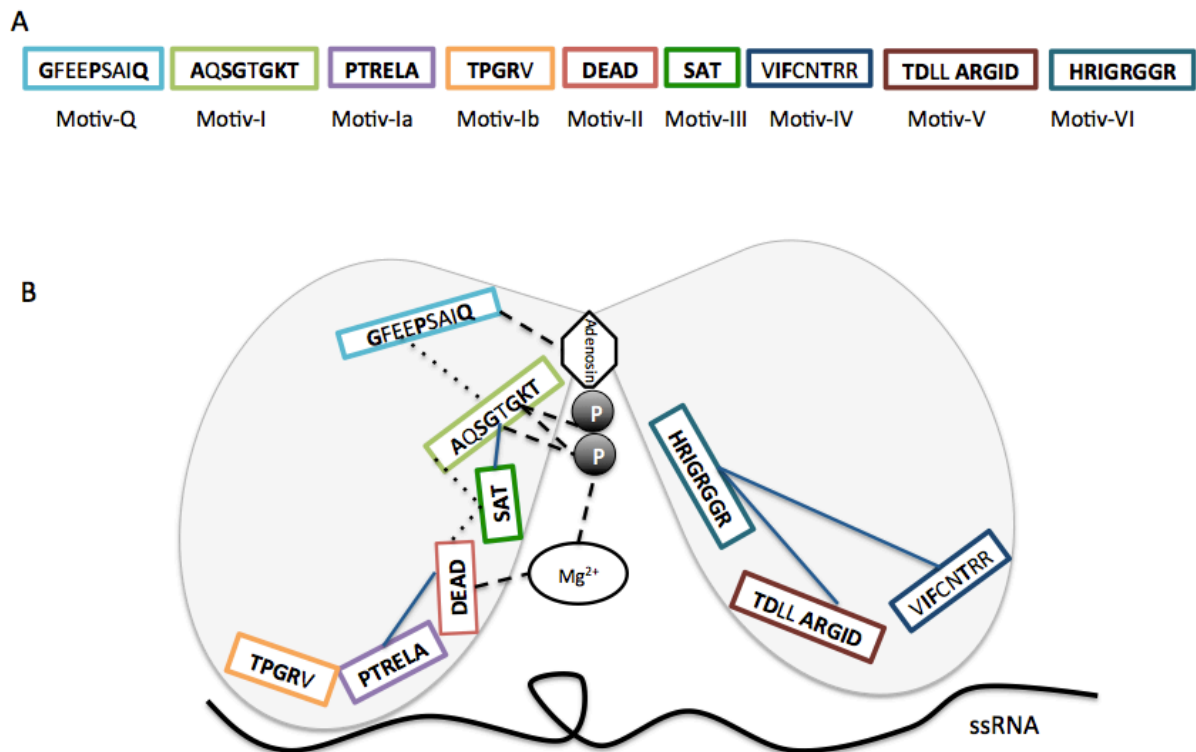


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung von eIF4A (geöffnete Konformation). A: Darstellung der konservierten Motive. B: Darstellung der Motive bei deren Funktion mit Einzelstrang (single strand (ss)) RNA, Motiv: Q, I, II VI zuständig für Nukleotid-Bindung und Hydrolyse, Ia, Ib, IV, V Bindung des Substrats (RNA). Das Motiv III spielt beim Separieren der RNA und der Hydrolyse eine Rolle. (Abbildung aus [25])

Die Kristallstrukturen des Proteins aus *Saccharomyces cerevisiae* (ScelF4A) konnten gelöst werden [26, 27]. Die Homologie von ScelF4A zu eIF4A1 liegt bei 66 %. Die Analyse dieser Kristallstrukturen von eIF4AIII und ScelF4A zeigte, dass die DEAD-Box-Helikasen in mindestens zwei Konformationen vorliegen: Während die offene Konformation dem ADP-gebundenen oder Apo-Zustand entspricht, wird die geschlossene Konformation bei ATP- und RNA-Bindung eingenommen. Dieser Konformationszyklus hängt mit der Separierung der doppelsträngigen mRNA zusammen [28].

1.1.2 Der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 4G (eIF4GI)

Das Ankerprotein eIF4G ist ein wichtiges Mitglied des eIF4F-Komplexes. eIF4G besitzt Interaktionsstellen für das Cap-bindende Protein eIF4E, für das poly-A-bindende Protein PABP sowie für eIF3. Für die DEAD-Box-Helikase eIF4A hat das Säugetier-eIF4G zwei Bindungsstellen: zum einen in der sogenannten mittleren Domäne (eIF4GMD), zum anderen speziell in der C-terminalen Domäne (eIF4GCD) [29-33]. Die letztere ist auch eine Bindungsstelle für Mnk1, die Map-Kinase I. Diese drei Interaktionsstellen werden durch HEAT-Domänen (Huntington-Elongation-A Subunit-TOR) gebildet. Ihr Aufbau folgt einer

superhelikalen Struktur aus 15 antiparallelen α -Helices, die sich paarweise wiederholen und bei der Vermittlung von Protein-Protein-Interaktion vorkommen [34].

Von eIF4G finden sich drei Paraloge (Abb. 1.3); eIF4GI und eIF4GIII erfüllen dieselbe Aufgabe bei der Translationsinitiation [35] und weisen, bezogen auf das gesamte Protein, eine Sequenzidentität von 45 % auf. Bei Betrachtung der Ähnlichkeit bezogen auf die Bindungsstellen von eIF4A ergibt sich für die mittlere Domäne eine Übereinstimmung von 79 % und für die C-terminale Domäne von 66 %.

Das paraloge eIF4GII wird als Tumorsuppressor bezeichnet, da es seine Funktion bei der Durchführung der Translationsinitiation über die IRES ausübt [36].

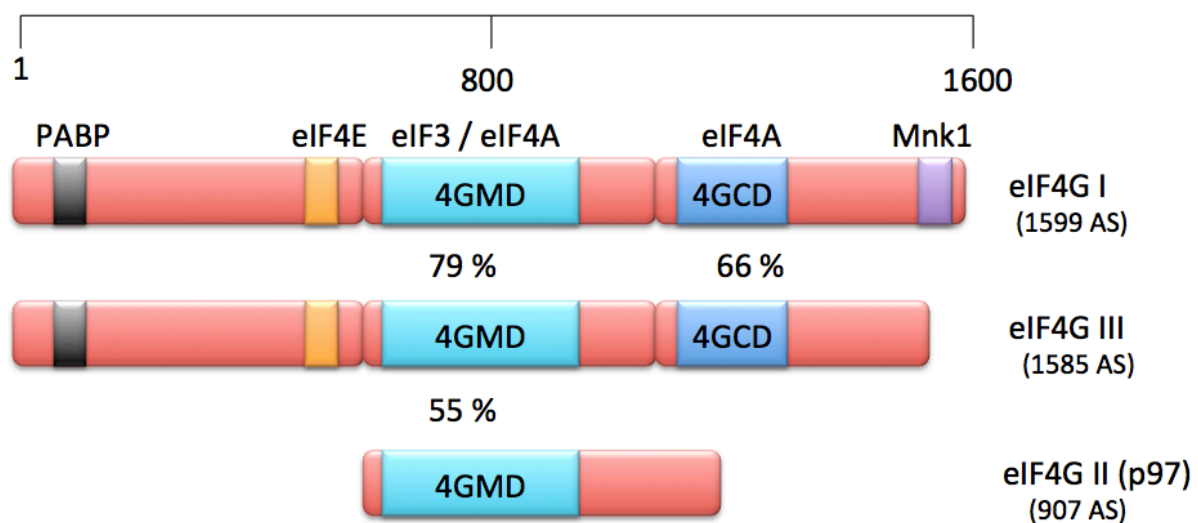


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung von den Isoformen von eIF4G. Die Isoform eIF4GI/eIF4GIII haben die gleiche Aufgabe bei der Translationsinitiation. eIF4GIII enthält nur die HEAT-Domäne von der mittleren Domäne und hift bei der IRES-Translationsinitiation mit [14].

Die mittlere eIF4A-Bindungsdomäne ist bei allen eIF4G-Proteinen konserviert, so auch in Hefe, wo die C-terminale Domäne nicht vorhanden ist. Für die Analyse dieser Interaktion wurde die Kristallstruktur des Komplexes eIF4GMD:eIF4A aus *Saccharomyces cerevisiae* gelöst [37]. In diesem Komplex läuft die Interaktion von eIF4GMD über die beiden N- und C-terminalen RecA-Domänen von eIF4A.

Der Zusammenhalt der beiden RecA-Domänen von eIF4A durch eIF4GMD erzeugt einen aktivierenden Effekt auf die Aktivität der eIF4A-ATPase innerhalb des Komplexes. Aus dieser Struktur ist deutlich erkennbar, dass die Hauptinteraktion die C-terminale Domäne von eIF4A einbezieht. Bei einer Verkürzung des N-Terminus von eIF4GMD kann durch einen

Pulldown-Assay gezeigt werden, dass ein Verlust diese Interaktion erfolgt. Entscheidend für diesen Verlust ist Tryptophan 579; durch die Mutation von Tryptophan 579 zu Alanin konnte jedoch derselbe Effekt beobachtet werden. Das Tryptophan ragt in eine Art Tasche auf der Oberfläche von eIF4A: diese Tasche könnte eine Interaktionsstelle für neue Inhibitoren darstellen [37].

Bei dem humanen Komplex von eIF4A:eIF4GMD wurde die Bindungsoberflächen von eIF4GMD mutiert, wodurch keine Bildung des 48 S-Präinitiationskomplexes zu beobachten ist, wodurch der Cap-abhängige Translationsinitiations-Mechanismus ausgeschaltet wird [29]. Hiermit wird die Wichtigkeit der mittleren Domäne (eIF4GMD) der Ankerproteine eIF4G in der Translationsinitiation deutlich.

Im Vergleich zur eIF4GMD hat die C-terminale Domäne von eIF4G (eIF4GCD) einen anderen Effekt auf eIF4A, der im nächsten Abschnitt erklärt wird.

Für den Komplex eIF4A:eIF4GCD wurde die Bindungsoberflächen von eIF4GCD mutiert, wodurch die Bildung des 48 S-Präinitiationskomplexes um den Faktor drei bis vier herabgesetzt wird. Daraus kann geschlossen werden, dass der Cap-abhängige Translationsinitiations-Mechanismus um den gleichen Faktor herabgesetzt ist [29]. eIF4GCD hat also einen inhibierenden Effekt auf die ATPase-Aktivität [33]. Aufgrund dieser beiden Beobachtungen wird eIF4GCD eine modulierende Funktion auf die Translation zugesprochen [29, 32, 33].

Die Kristallstruktur von eIF4GCD (1234-1572) zeigt deutlich die HEAT-Domäne [38].

Das Zusammenspiel der beiden Domänen (eIF4GMD/eIF4GCD) wurde durch strukturelle Untersuchung mittels *Small Angle Scattering* und isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) untersucht [29, 30, 32]. Aus diesen Daten konnte ein hypothetischer Bindungsmechanismus postuliert werden. eIF4A wird zuerst von eIF4GCD gebunden (Abbildung 1.4A), anschließend wird eIF4A an die mittlere Domäne (Abbildung 1.4B) übergeben.



Abbildung 1.4: Modell des Interaktionsverlaufs im eIF4F-Komplex, A: eIF4A bindet an eIF4GCD und wird an die eIF4GMD (B) übertragen.

1.2 Cap-abhängige Translationsinitiation und Krebs

Bei vielen Krebsarten liegt eine erhöhte Genexpression für die Komponenten des eIF4F-Komplexes vor, was mit einer erhöhten Proliferationsrate einhergeht. Für die Zellproliferation ist die Produktion von Proteinen eine Voraussetzung für die Zelle, um zu wachsen und sich zu teilen. Als Antwort auf die Cytokinese werden Wachstumsfaktoren und Hormone freigesetzt, die eine Erhöhung der Proteinsynthese zur Folge haben. Damit verbunden ist ebenfalls die Hochregulierung der Translationsinitiation [10].

1.2.1 Regulation des eIF4F-Komplexes

Einer der für die Proliferation verantwortlichen Signaltransduktionswege ist der *Mammalian Target of Rapamycin* (mTOR)-Weg. mTOR wird via Phosphatidylinositid-3-Kinase (PI3K) und Serin-Threonin-Protein-Kinase (AKT) aktiviert [39].

Bei der mTOR-PI3K-AKT-Signaltransduktion läuft die Regulation des eIF4F-Komplexes über zwei Wege. Zunächst bindet eIF4A an den Tumorsuppressor *Programmed Cell Death Protein* (PDCD4) [40] und verhindert so diese Bindung an eIF4G, was weiter eine Inhibierung der Translationsinitiation zur Folge hat. Zusätzlich wird die Signalkaskade für Apoptose eingeleitet [41]. Durch die Aktivierung des mTOR-Signalwegs wird andererseits die S6-Kinase aktiviert, die die Phosphorylierung des PDCD4 ausführt. Damit wird das gebundene eIF4A freigesetzt und kann die Bindung mit eIF4G eingehen und die Bildung des eIF4F-Komplexes anstoßen (Abbildung 1.5A) [42].

Das phosphorylierte PDCD4 wird über eine Ubiquitynylierung dabei vom Proteasom abgebaut [41]. Für den Komplex von PDCD4 mit eIF4A wurde die Kristallstruktur bereits dargestellt [43]. PDCD4 bindet zwischen den beiden RecA-Domänen von eIF4A und inhibiert so die Bindung an eIF4G und der mRNA [44].

Der zweite und häufigste Weg, den Cap-abhängigen Translationsinitiations-Mechanismus zu regulieren, ist die Interaktion der Cap-Struktur der mRNA mit eIF4E. Die Formation des eIF4F-Komplexes wird auch von den sogenannten Repressor-Proteinen 4E-BP (*4E-Binding-Proteins*) kontrolliert. Diese konkurrieren mit eIF4G um die Bindung von eIF4E, wodurch die Translation inhibiert wird. Durch die Phosphorylierung von mehreren Serin- und Threonin-Resten von 4E-BP kann die Bindung zu eIF4E vermindert werden und eIF4E wird frei, um den eIF4F-Komplex zu bilden (Abbildung 1.5B) [39].

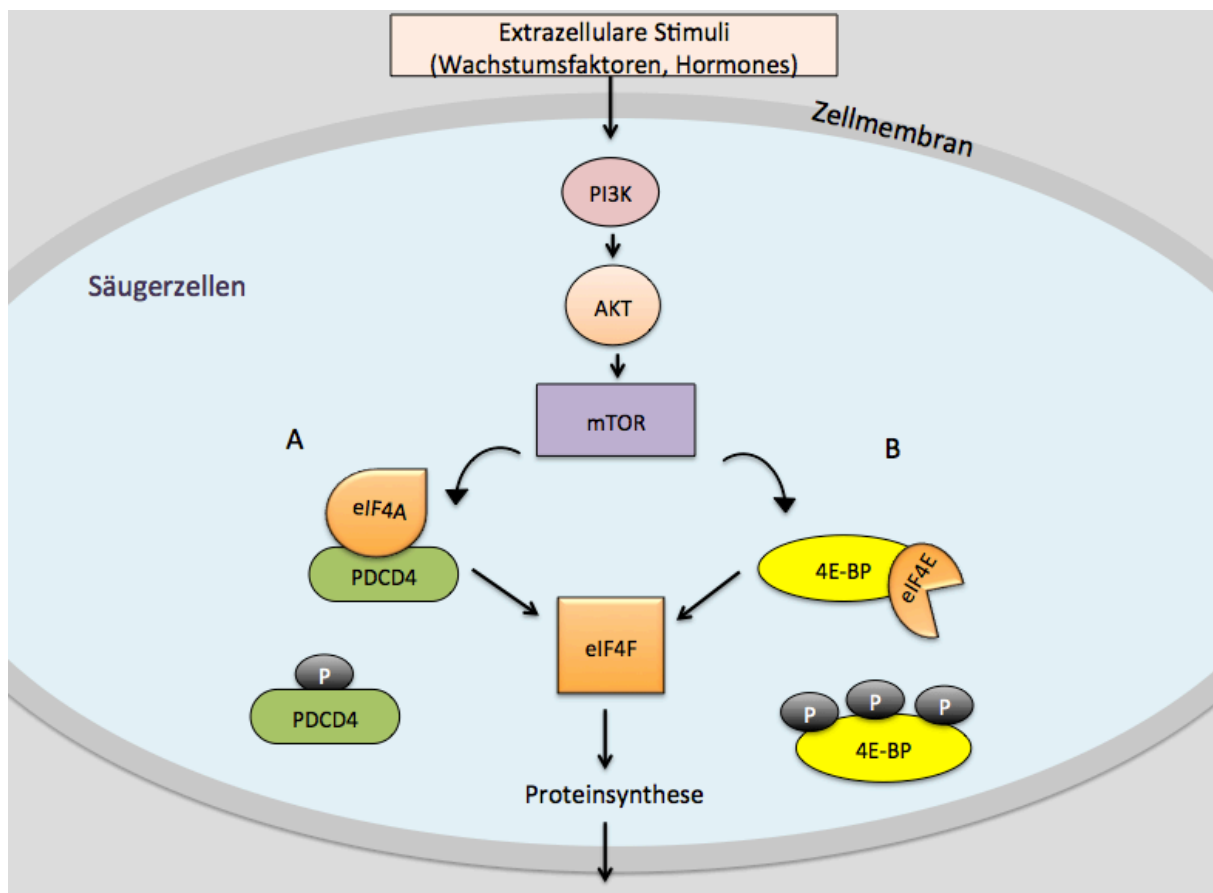


Abbildung 1.5: Regulation des eIF4F-Komplexes durch die mTOR-Signalkaskade. A: PDCD4-Interaktion mit eIF4A B: Interaktion 4E-BP mit eIF4E [41].

eIF4A ist ebenfalls ein wichtiger Mitspieler im eIF4F-Komplex, da es für die Entwindung des 5'UTRs der mRNA von Wachstumsfaktoren und anderen metabolischen Enzymen verantwortlich ist. Es gibt zwei verschiedene Formen des 5'-UTRs der mRNA, die einen Einfluss auf den eIF4F-Komplex hat. Den ersten Typen von mRNA bezeichnet man als *stark*; dieser hat eine kurze und unstrukturierte 5'-UTR. Diese mRNA kommt meistens bei Enzymen/Proteinen vor, die zu den Haushaltsgenen gehören [3]. Die Translation dieser mRNA hat einen schnellen Verlauf über den Cap-abhängigen Translationsinitiations-Mechanismus (Abbildung 1.6A).

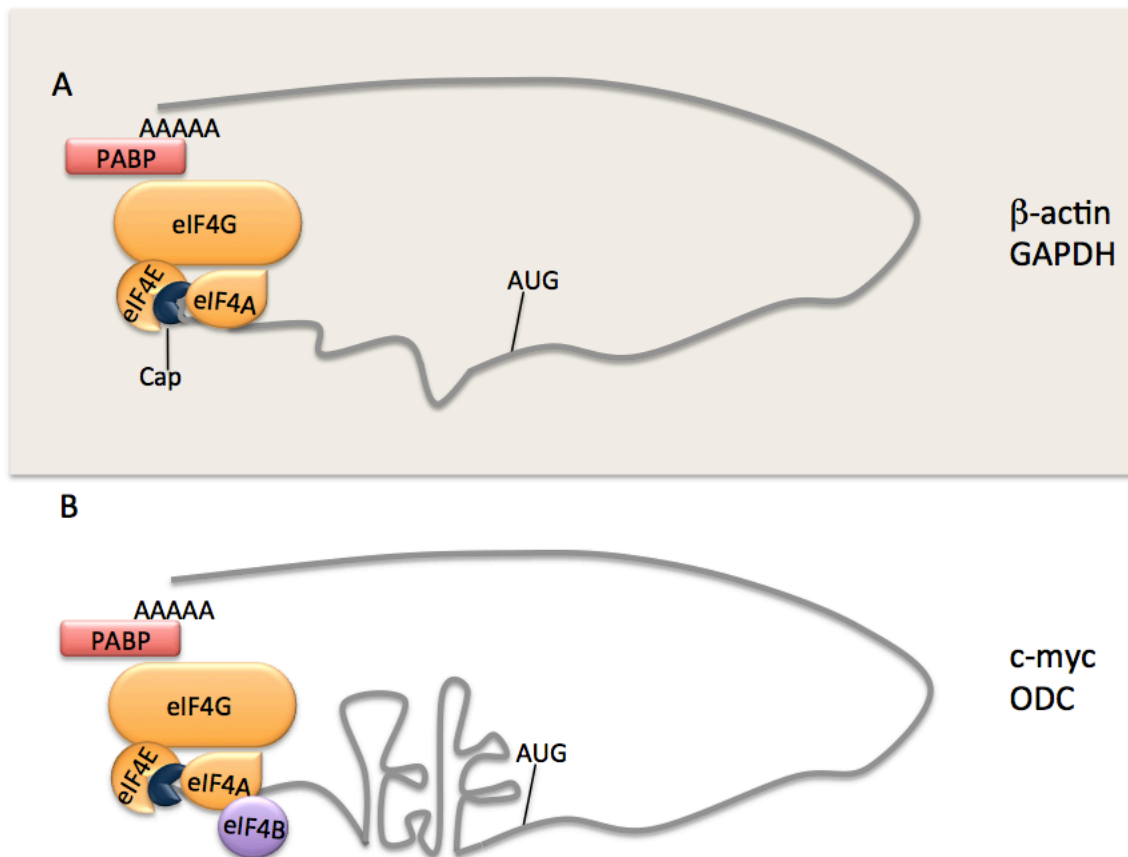


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung der Funktion des eIF4-Komplexes in Anwesenheit von A: starker mRNA und B: schwacher mRNA [45].

Der zweite Typ sind die sogenannten *schwachen* mRNAs mit einer langen, strukturierten 5'-UTR und dadurch mit einer höheren Abhängigkeit vom eIF4-Komplex in Hinblick auf ihre Translation. Die beiden eukaryotischen Initiationsfaktoren 4B (eIF4B) und 4H (eIF4H) erhöhen die Entwindungsgeschwindigkeit von eIF4A [46].

Diese beiden Faktoren kommen meistens bei der Translation schwacher mRNA zum Tragen (Abbildung 1.6B). Ein Zusammenhang besteht daher auch zwischen der Zunahme der Translation schwacher mRNA und der Zunahme des Expressionslevels von eIF4E [47].

1.2.2 Inhibitoren des eIF4-Komplexes

Bislang wurden drei Inhibitoren für den Initiationsfaktor eIF4E identifiziert. Den ersten stellt die Antisense-RNA gegen eIF4E (ISIS 183750) dar, welche die Proteinsynthese von eIF4E unterbricht und dadurch die Bildung des eIF4-Komplexes verhindert. Diese Verbindung wird von der Firma *ISIS Pharmaceuticals* (Carlsbad, CA, U.S.A.) weiter entwickelt und befindet sich in der klinischen Phase I/II [48, 49].

Der zweite Inhibitor ist 4EGI-1; er verhindert die Bindung von eIF4E an eIF4G. Gefunden wurde er durch ein Hochdurchsatz-Screening mittels eines Fluoreszenz-Polarisation-Assays und wurde bislang bei T-Zellen-Leukämie in mehreren präklinischen Phasen getestet [50, 51]. Der dritte Inhibitor ist Ribavirin, welches 7'-Methylguanosin simuliert und sich in der klinischen Phase I befindet, wo bereits seine Relevanz bei akuter myeloischer Leukämie gezeigt wurde [52].

eIF4A wurde im hepatozellulären Karzinom (Leberzellkarzinom) hochreguliert gefunden. Auch in schwarzen Hautkrebszellen und der primären Vorstufe von malignen Melanomen konnte eine Überexpression von eIF4A festgelegt werden [53, 54].

Für den Initiationsfaktor eIF4A sind bislang drei Inhibitoren bekannt, die sämtlich als Naturstoffe durch verschiedene Hochdurchsatzverfahren gefunden wurden [55]. Pateamine A (CID 10053416) wurde aus dem Marineschwamm *Mycale sp.* isoliert. Diese Verbindung zeigt *in vitro* eine antifungale und cytotoxische Aktivität. Seine Wirkungsweise besteht darin, dass eIF4A in einen Zustand gesteigerter Affinität für RNA in Abwesenheit von ATP überführt wird; dieser Zustand kann keine Bindung zu eIF4G mehr eingehen [56]. Hippuristanol (CID 998182) ist ein Steroid, welches aus der Koralle *Isis hippuris* isoliert wurde. Es blockiert die Bindung zur mRNA [57]. Silvestrol (CID 21301152) hingegen wurde aus der Pflanze *Genus Aglaia* (Meliaceae) isoliert. Es dimerisiert eIF4A, wodurch die Bindung zum eIF4F-Komplex unterbrochen wird [58]. Alle diese drei Inhibitoren befinden sich in vorklinischen Studien und werden zur Untersuchung von mRNA-Strukturen und von IRES genutzt.

Der Cap-abhängige Translationsinitiations-Mechanismus (eIF4A), der zur Krebsentstehung beiträgt, kann durch Behandlung mit Silvestrol, Hippuristanol und Pateamine A herabgesetzt werden (Tab.1). Bei der Behandlung von Krebszellen mit Silvestrol konnte ein Eintreten des Zellarrests sowie die Apoptosis von Krebszellen beobachtet werden. Es wurde auch gezeigt, dass bei Onkogenen die mRNA aus 12-Guanin-Quartett (CGG₄)-Motiven besteht, welche dann eine RNA-G-Quaddruplex-Struktur bilden, zum Beispiel beim Onkogen c-myc [59]. Dies macht wiederum einen hohen Bedarf für eIF4F-Komplex dieser mRNAs bei der Translation plausibel.

Ein anderer Inhibitor ist das antiinflammatorische und antineoplastisch wirkende Prostaglandin *15d PGJ2*, das die Bindung zwischen eIF4A und eIF4G unterbricht; in zellulären Tests wurde gezeigt, dass die Translation inhibiert wird [60].

Tabelle 1.1 gibt einen Überblick über die momentan in der Entwicklung befindlichen Krebstherapeutika auf Basis von eIF4F-Komplex-Inhibitoren.

Tabelle 1.1: Therapeutika von Anti-eIF4F-Komplex und deren Entwicklungsstufen.

	Inhibitor	Wirkungsweise	Entwicklungsstufe	Krebsart
eIF4E	Ribavirin [52]	mRNA 5'cap Struktur nachahmend	Phase I (Stand 2013)	akute myeloische Leukämie
	4EGI-1 [50, 51]	Verhindert die Bindung an eIF4G	Präklinisch (Stand 2013)	kleinzelliges Bronchialkarzinom Leukämie
	ISIS 183750 (4E-ASO4) [48, 49]	Antisense Oligonukleotide zu eIF4E	Phase I (Stand 2015)*	Lungenkarzinom
eIF4A		Steigert die Affinität zu RNA und verhindert die Bindung zu eIF4G		maligne Melanom- Zellen (schwarzer Hautkrebs)
	Pateamine A [61, 62]		Präklinisch (Stand 2013)	
	Hippuristanol [57, 63]	Blockierung der Bindung an mRNA	Präklinisch (Stand 2011)	T-Zellen-Leukämie
	Silvesterol [64, 65]	Dimerisation von eIF4A	Präklinisch (Stand 2014)	T-Zellen-Leukämie

* ISIS Pharmaceuticals (<http://www.isispharm.com/index.htm>)

2 Hochdurchsatztaugliche Tests (Assays) in der Medikamentenentwicklung

Die Entwicklung eines neuen Medikaments ist ein langer und kostspieliger Weg. Von der Leitstruktur bis zu am Markt zugelassenen Medikamenten kann es zehn bis 15 Jahre dauern (Abb. 2.1) [66]. Der erste Punkt innerhalb dieses langwierigen Prozesses ist die Identifizierung eines „Ziels“ (*target*), d.h. in der Regel eines Proteins, das eine pharmakologische Relevanz hat.

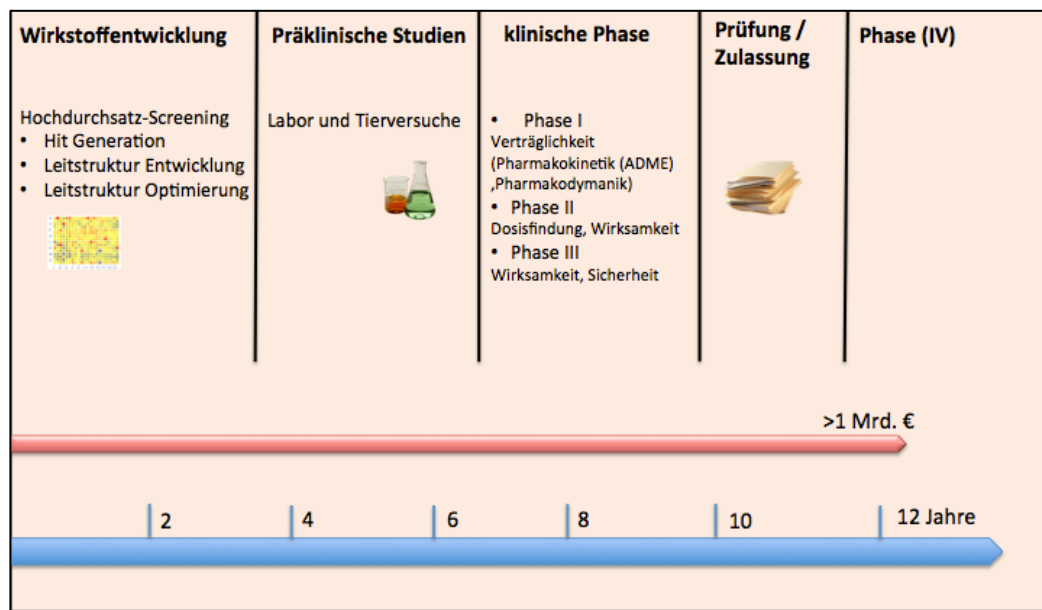


Abbildung 2.1: Schematische Übersicht der Medikamentenentwicklung [66-68].

Der erste Schritt innerhalb der Identifizierung des *target* ist die Entwicklung eines hochdurchsatztauglichen Tests oder Hochdurchsatz-Screenings (*High-Throughput Screening*, HTS, auch Assay). Mit solchen Assays werden die Bibliotheken bioaktiver chemischer Verbindungen durchsucht, um eine neue Leitstruktur zu finden (siehe auch 2.1).

Auf die einzelnen Kriterien eines Hochdurchsatz-Screenings wird im Verlaufe des Abschnitts 2.1 eingegangen.

Nach Erhalt eines sogenannten Hits, d.h. der Identifizierung wirksamer Verbindungen, werden diese einer Validierung unterzogen, wobei ein Austausch der Assay-Methode genutzt wird. Bei diesem Vorgehen wird eine Struktur-Wirkungs-Beziehung aufgestellt, wozu oft auch auf die Methode der Kristallisation zurückgegriffen wird, was bei der Leitstruktur-Optimierung ebenfalls unterstützend wirkt. Bei der Leitstruktur-Optimierung wird durch

Synthese die potenzielle Verbindung im Hinblick auf den IC₅₀-Wert (mittlere inhibitorische Konzentration) verbessert.

Der nächste Punkt im Procedere ist die Hit-Verfeinerung, wobei die physikalischen und pharmakokinetischen Eigenschaften der untersuchten Verbindung auf die Kriterien nach ADME (Aufnahme/Absorption, Verteilung/Distribution, Metabolismus und Ausscheidung/Exkretion) hin geprüft werden [68].

Die erste Einteilung der Verbindung erfolgt nach den 5 Regeln von Lipinski [69]: (i) nicht mehr als fünf Donoren von Wasserstoffbrücken (Aminogruppen und Hydroxygruppen), (ii) nicht mehr als zehn Akzeptoren für Wasserstoffbrücken (Sauerstoffgruppen, Stickstoffgruppen), (iii) molare Masse (M_w) nicht höher als 500g/mol, (iv) ein Verteilungskoeffizient (log P) zwischen n-Oktanol und Wasser von maximal 5 (lipophile chemischen Verbindungen), (v) polare Oberflächen (*Polar Surface Area* (PSA): weniger als 63 Å² ist besser, damit es über die Blut-Hirn-Schranke aufgenommen werden kann [70].

Die meisten gefundenen Verbindungen weisen einen IC₅₀-Wert um 1-10 µM auf. Mittels chemischer Modifikation/Synthese wird eine Optimierung des IC₅₀-Werts durchgeführt. Dieses Vorgehen wird „Leitstruktur-Optimierung“ genannt und auch in den präklinischen Studien eingehalten. Hierbei werden die Medikamentenvorstufen *in vitro* und *in vivo* auf Pharmakokinetik hin getestet [68].

Falls diese Phase erfolgreich verlaufen ist, werden die Vorstufen in die klinischen Phasen überführt. Bei Phase I werden die Medikamente am gesunden Probanden auf Verträglichkeit (Pharmakodynamik, Pharmakokinetik) getestet. In Phase II wird die Wirksamkeit und Dosisfindung an 10-100 Patienten durchgeführt. In der letzten Phase III wird das Medikament an 1.000-10.000 Patienten auf Wirksamkeit (meistens auch im Vergleich mit anderen bereits auf dem Markt erhältlichen Medikamenten) getestet. Nach erfolgreicher Durchführung kann das Medikament auf dem Markt zugelassen werden. Danach erfolgt Phase IV über den Verlauf von zwei Jahren. Die Durchführung ab den präklinischen Studien obliegt den Pharmaunternehmen. Universitäten leisten hingegen einen größeren Beitrag bei der Entwicklung pharmakologischer Relevanzziele und bei der Wirkstoffentwicklung [67].

2.1 Hochdurchsatz-Screening (HTS)

Das Hochdurchsatz-Screening ist der Anfang der Entwicklung einer neuen Leitstruktur. Es wird durchgeführt, um neue Leitstrukturen zu finden für Enzyme/Rezeptoren/Hormone und

Protein-Protein-Interaktionen. Um ein Hochdurchsatz-Screening durchzuführen, muss ein Assay einige Voraussetzungen erfüllen. Innerhalb des Assays wird ein Lichtimpuls (Absorption, Fluoreszenz, Lumineszenz) zur Signaldetektion genutzt. Wichtig für den Ablauf sind ein kleines Probenvolumen, ein robuster einfacher Assay-Aufbau, Assay-Fenster¹, Reproduzierbarkeit, Sensitivität, Spezifität, Genauigkeit bei der Diskriminierung von großen Mengen an bioaktiven chemischen Verbindungen, Wirksamkeit, Lösungsmittel-Toleranz und ein geringer Verbrauch an Assay-Reagenzien [68].

Bei Hochdurchsatz-Screenings werden die Hits, also die erstmaligen Hinweise auf Leitstrukturen, durch einmalige Messung bestimmt. In den Naturwissenschaften gilt diese Anwendung als problematisch, da meist Duplikate oder Triplikate bestimmt werden und zudem mit methodischen, instrumentellen und menschlichen Fehlern zu rechnen ist. Das Signal/Hintergrund-Verhältnis wird in den meisten Hochdurchsatzverfahren auch als „Assay-Fenster“ bezeichnet. Die aufgeführten Fehler können nicht aus dem Assay-Fenster ausgelesen werden. Zum Beispiel kann ein Assay trotz eines sehr guten Signal/Hintergrund-Verhältnisses aufgrund der oben aufgeführten Fehlerquellen enorme Standardabweichungen aufweisen. Deswegen ist es besonders wichtig, dass die Qualität des Assays über den z-Faktor bestimmt wird (2.1.1) [71].

2.1.1 Bestimmung des z-Faktors

Die Bestimmung des z-Faktors kann im HTS als Kontrolle genutzt werden und muss während der Durchführung des Hochdurchsatzverfahrens auf jeder Platte oder jeder zweiten Platte durchgeführt werden.

$$z = 1 - \frac{3 SD_{positive\ Kontrolle} + 3 SD_{negative\ Kontrolle}}{M_{positive\ Kontrolle} - M_{negative\ Kontrolle}}$$

Formel 2.1

Bei der Berechnung des z-Faktors (normal) wird die Standardabweichung (*SD standard deviation*) der Positivkontrolle sowie der negativen Kontrolle auf den Mittelwert (M) der Kontrollen bezogen. Der z'-Faktor (robust) bezieht sich ausschließlich auf eine Kontrolle.

$$z' = 1 - \frac{3 SD_{Probe\ Kontrolle} + 3 SD_{Probe\ Kontrolle}}{M_{Probe\ Kontrolle} - M_{Probe\ Kontrolle}}$$

¹ Signal/Hintergrund-Verhältnis (S/B) oder Signal/Rausch-Verhältnis (S/N)

Formel 2.2

Durch die z-Faktoren kann die Qualität des Assays wie folgt eingeteilt werden.

- (a) $z = 1$ wäre der ideale Assay ($SD = 0$ oder der dynamische Bereich wäre unendlich).
 - (b) $1 > z \geq 0.5$ sind die Kennzeichen für einen exzellenten Assay; bessere Separation des Signals für die Hits-Auslese.
 - (c) $0.5 > z > 0$ kann als eine schlechte Separation des Signal aufgefasst werden.
- Ein Assay mit $z=0$ liefert keine Ja/Nein-Antwort.
- (d) bei $z < 0$ bedeutet, es ist kein HT-Screening möglich [71].

2.1.2 Hit-Auslese: der Z-Score

Der Z-Score dient zur Auslesung der aktiven Substanzen aus den HT-Screenings, also zur Hit-Auslese. Falls ein Inhibitor gesucht wird, wird der Z-Score negativ, bei einem Aktivator wird dieser positiv. Falls es keinen Effekt gibt, ist der Z-Score gleich Null.

Der Z-Score kann als eine Einteilung der Messwerte in eine Normalverteilung verstanden werden (Abb. 2.2). Ein Problem des Z-Scores ist der fehlende Bezug auf die Kontrollen, was beim HTS ein Problem ist [72].

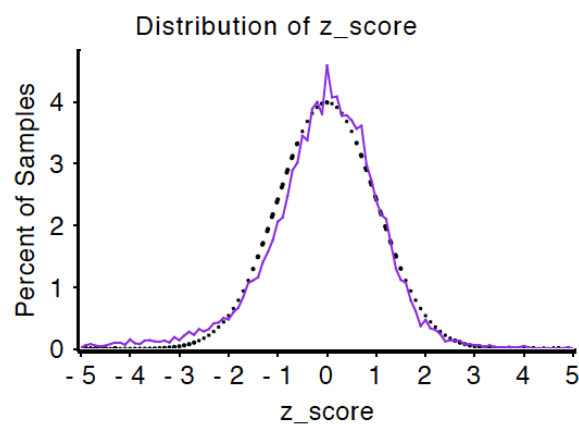


Abbildung 2.2: Die normale Verteilung des Z-Scores eines HT-Screenings

Falls die Werte annähernd der normalen Verteilung sind, kann ein Hit-Limit ab ± 3 oder noch höher gesetzt werden.

$$z - Score = \frac{Messwert - M_{Messwert}}{SD_{Messwert}}$$

Formel 2.3

Auch die relative Aktivität wird zur Hit-Identifizierung herangezogen. Hierbei werden die Messwerte der chemischen Verbindungen auf die negative Kontrolle oder auf die positive Kontrolle mit einbezogen [72].

$$\text{relative Aktivität} = \frac{\text{Messwert} - M_{\text{Messwerte}}}{M_{\text{Messwerte}}}$$

Formel 2.4

Bei der relativen Aktivität werden die Messwerte mit dem Mittelwert subtrahiert und durch den Mittelwert geteilt. Zum Beispiel: Beträgt die relative Aktivität -0.5, kann die Aussage getroffen werden, dass hier ein 50 %-iger Signalverlust im Vergleich zu anderen Proben auf der Platte erfolgt ist [72].

Für die Entdeckung von Leitstrukturen in Protein-Protein-Interaktionen werden standardmäßig die folgenden Assays verwendet: Fluoreszenz-Polarisation, Alpha-Test und FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*) [73]. In der vorliegenden Arbeit wird die Methode TR-FRET (*Time-Resolved Fluorescence Resonance Energy Transfer*) verwendet.

2.2 Homogener Zeit aufgelöster TR-FRET-Assay

Der HTFR-Assay ist eine Mischung aus der zeitaufgelösten Fluoreszenz (*Time-Resolved Fluorescence*, TRF) und dem Förster-Resonanz-Energie-Transfer oder Fluoreszenz-Resonanzen-Energie-Transfer (FRET), wodurch es eine starke Methode für die Wirkstoffentwicklung darstellt [73].

Der FRET benötigt zwei Fluorophore, einen Donor und einen Akzeptor. Protein-Protein Interaktionen können durch Labeln der jeweiligen Interaktionspartner mit Fluorophoren mittels FRET untersucht werden. Für FRET müssen zwei Faktoren erfüllt werden: zunächst müssen Donor und Akzeptor spektral überlappen. Zweitens muss der Abstand zwischen Donor und Akzeptor gering sein. Der für ein Donor-Akzeptor-Paar charakteristische Abstand wird auch als Förster-Radius (R_0^6) bezeichnet. Eine FRET-Energieübertragung von 50 % erfolgt bei einem Abstand von R_0 [74].

Die TRF basiert auf den Eigenschaften der Lanthanoid-Ionen, die als Donor fungieren [75]. Eine dieser Eigenschaften der Ionen ist die sehr lange Emissionslebensdauer von μsec bis msec . Dadurch kann das Problem der Autofluoreszenz von Serum und chemischen

Verbindungen, die beim HTS eingesetzt werden, vernachlässigt werden. Die zweite Eigenschaft ist eine große Stokes-Verschiebung (280nm), was die Unterscheidung zwischen Anregung und Emission gut ermöglicht [76]. Genutzt werden die Lanthanoide Samarium (Sm), Europium (Eu), Terbium (Tb) und Dysprosium (Dy).

Der Akzeptor-Antikörper wiederum wird vom hetero-hexametrischen Phycobilisom gebildet, welches eine Größe von 105 kDa besitzt und bei der Photosynthese bei der Rotalge eine Rolle spielt. Das Absorptionsmaximum im Spektrum von Phycobilisomen liegt bei 650–660 nm. Durch die Vernetzung von Phycobilisomen verschiebt sich das Spektrumsoptimum auf 665 nm und erhöht sich die Stabilität. Das Pigment Allophycocyanin gehört zu den Phycobiliproteinen, was an das Phycobilisom über eine kovalente Bindung zu einem Cystein gebunden wird [75] . Es läuft beim Hersteller unter der Bezeichnung Cisbio XL665.

So weisen z.B. Cryptate EU/Tb und XL665 eine hohe Quantenausbeute aus, und die spektrale Überlappung entspricht den Kriterien, womit sie ein ausgezeichnetes Donor-Akzeptor-Paar abgeben. Einen schematischen Überblick über den Ablauf eines HTR-FRET-Tests gibt Abb. 2.3.

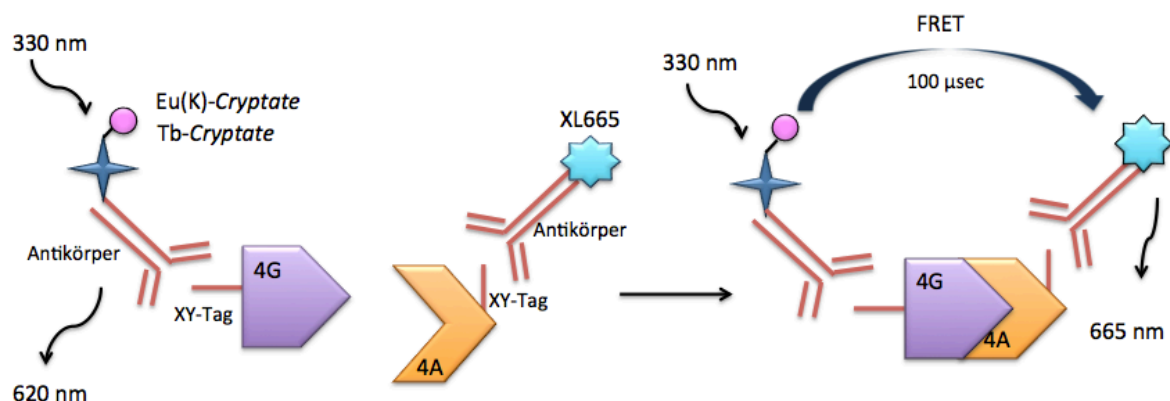


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des HTR-FRET-Tests von Cisbio Assays . Die Detektion der Interaktion verläuft über Antikörper-Bindung an den jeweiligen Epitop-TAG des Proteins (z.B. GST-Tag). Bei der Bildung eines Komplexes kann ein Energie-Transfer stattfinden. Der Donor-Antikörper EU(K)-Cryptate/Tb-Cryptate hat eine Anregungswellenlänge von ca. 330 nm. Die Emissions-Wellenlänge des Donorantikörpers beträgt 620 nm und die des Akzeptorantikörpers 665 nm. Es werden jeweils beide Emissions-Wellenlängen ausgelesen, wodurch der Energie-Transfer berechnet werden kann [75].

Da es sich bei diesem Assay um einen Immunoassay handelt, muss bei der Etablierung auf den sogenannten *High-Dose-Hook-Effekt* geachtet werden. Der Hook-Effekt wird erklärt als eine Übersättigung von Analyten am Antikörper, wodurch kein zusätzlicher Analyt im

Rahmen der wirklichen Konzentration mehr gebunden und nur ein geringeres HTR-FRET-Signal gemessen werden kann. Um ein solches negatives Signal zu vermeiden, werden parallele Messungen von verschiedenen Verdünnungen des Analyten gemessen, was beim HTR-FRET auch „Titration“ genannt wird (Abb.2.4) [77].

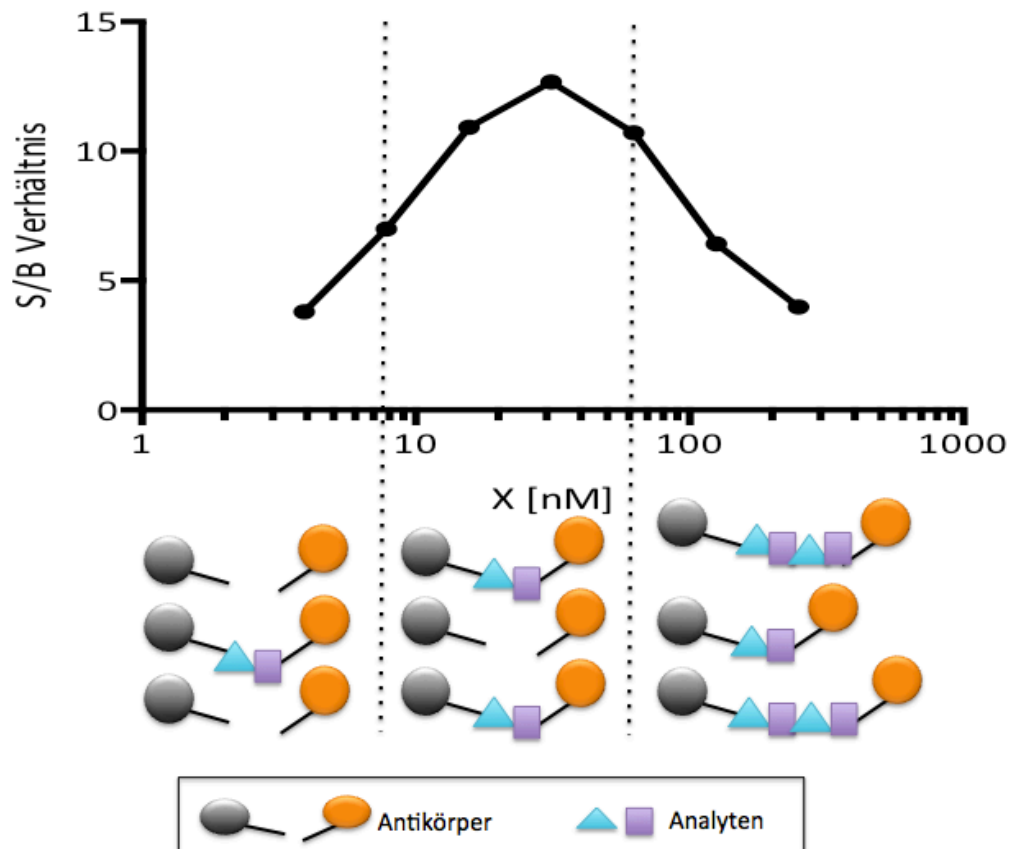


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung des Hook-Effektes. Das Signal/Hintergrund-Verhältnis wird gegen die Konzentration des Analyten aufgetragen. Bei einer Übersättigung der Antikörper ist ein Verlust des Signal/Hintergrund-Verhältnisses erkennbar.

Das Auslese-Prinzip beim HTS ist der Signalverlust. Wenn eine Verbindung die Interaktion zwischen eIF4A und eIF4G verhindert, kann kein Energietransfer stattfinden. Für die Etablierung eines Assays sollte daher die Protein-Protein-Interaktion am besten auch biochemisch und strukturell untersucht werden.

3 Zielsetzung der Arbeit

Translationsinitiationsfaktoren des eIF4F-Komplexes sind in vielen Krebsarten hochreguliert. Einer der Gründe sind die sogenannten schwachen mRNAs, diese verfügen über lange und stark strukturierte 5'-nicht-kodierende Bereiche, die bei vielen zentralen regulatorischen mRNAs z.B. der Ornithindecaboxylase (OCD) oder des Endothelwachstumsfaktors (*Vascular Endothelial Growth Factor*, VEGF) vorkommen (Abschnitt 1.2.1).

Aus diesem Grund ist der eIF4F-Komplex ein potenziell interessantes Ziel für die Entwicklung neuer Anti-Krebs-Medikamente (Abschnitt 1.2.2). Ein Ziel dieser Arbeit ist daher die Entdeckung einer bioaktiven Substanz, welche die Komplexbildung zwischen eIF4A und eIF4G aus *Homo sapiens* inhibieren kann. Zu diesem Zweck soll in dieser Arbeit ein HTR-FRET-Assay, der hochdurchsatztauglich ist, entwickelt werden.

Zudem wird die Interaktion zwischen eIF4A und der regulatorischen C-terminalen Domäne eIF4GICD des Ankerproteins eIF4GI biochemisch näher charakterisiert und strukturell untersucht. Hierzu werden verschiedene Methoden der Kristallographie angewendet. Zudem soll die Komplexbildung mittels Gel-Permeations-Chromatographie und Bio-Layer-Interferometrie (BLI) untersucht werden. Diese Untersuchungen sollen einen Aufschluss über den regulatorischen Effekt von eIF4GICD auf eIF4A geben.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Antikörper

Tabelle 4.1: Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller
Eu(K)-HA	Cisbio Bioassays, Godolet, FRA
Tb-HA	Cisbio Bioassays, Godolet, FRA
Eu(K)-His	Cisbio Bioassays, Godolet, FRA
Tb-His	Cisbio Bioassays, Godolet, FRA
XL665-Myc	Cisbio Bioassays, Godolet, FRA
XL665-GST	Cisbio Bioassays, Godolet, FRA

4.1.2 Chemikalien

Tabelle 4.2: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Agar	AppliChem, Darmstadt, DEU
Agarose	Promega GmbH, Mannheim, DE
Ammoniumhydrogen Citrat	AppliChem, Darmstadt, DEU
Ammoniumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Ammoniumpersulfat	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Ampicillin	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
BugBuster Master Mix	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
BSA	Sigma-Aldrich, München, DEU
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, München, DEU
Citrat	Sigma-Aldrich, München, DEU
cOmplete, EDTA-Free	Roche Life Science, Mannheim, DE
Coomassie® Brilliant Blue G250	Serva, Heidelberg, DEU
DTT	AppliChem, Darmstadt, DEU

Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, München, DEU
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DEU
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, DEU
EnzChek® Phosphat Assay Kit	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Gluathion-Sperarose 4B	GE Healthcare, Solingen, DEU
Hefeextrakt	AppliChem, Darmstadt, DEU
Hefe RNA	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
HEPES	AppliChem, Darmstadt, DEU
Imidazol	AppliChem, Darmstadt, DEU
IPTG	AppliChem, Darmstadt, DEU
Kanamycinsulfat	AppliChem, Darmstadt, DEU
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, München, DEU
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, München, DEU
Natriumacetat	Carl Roth, Karlsruhe, DEU
Natrium Chlorid	Carl Roth, Karlsruhe, DEU
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe, DEU
Natrium Malonat	Sigma-Aldrich, München, DEU
Ni-NTA Superflow	Qiagen, Hilden, DEU
Polyacrylamid 30 %	Carl Roth, Karlsruhe, DEU
Polyethylene glycol 3350	Hampton Research, Aliso Aiejo, CA, USA
reduziertes Glutathion	Sigma-Aldrich, München, DEU
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
SDS	AppliChem, Darmstadt, DEU
SYPR Safe DNA Gel stain	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
SYPRO® Orange Protein Gel Stain	Sigma-Aldrich, München, DEU
TCEP	Merck KGaA, Darmstadt, DEU
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, DEU
Tris ultrapure	AppliChem, Darmstadt, DEU

Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, DEU
Trypton	AppliChem, Darmstadt, DEU
Tween 20	Sigma-Aldrich, München, DEU
Unstained protein Marker	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München, DEU
2-Propanol	AppliChem, Darmstadt, DEU

4.1.3 Enzyme

Tabelle 4.3: Verwendete Enzym

Enzym	Hersteller	Puffer
BamHI	NEB*, Frankfurt am Main, DEU	NEB Puffer 2.1
DNase I	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA	-
EcoRI	NEB, Frankfurt am Main, DEU	NEB Puffer 3.1
NdeI	NEB, Frankfurt am Main, DEU	NEB Cutsmart
T4 DNA Ligase	Roche	T4 Ligase Puffer with ATP
Thrombin	Sigma-Aldrich, München, DEU	-
XhoI	NEB, Frankfurt am Main, DEU	NEB Cutsmart
NheI	NEB, Frankfurt am Main, DEU	NEB Puffer 2.1

*NEB =New England Biolabs

4.1.4 Geräte

Tabelle 4.4: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Äkta Prime	GE Healthcare, Solingen, DEU
Äkta Prime Plus	GE Healthcare, Solingen, DEU
BLItz™-System	Forte-Bio, Pall, Portsmouth, UK
Vivaspin 10k, 30k	Satorius, Göttingen, DEU
ChemiDoc XRS+	BioRad, München, DEU

Constant Cell disruption systems	constant cell, Northants, UK
<i>CrystalHarp™</i>	Molecular Dimensions, Newmarket, UK
Crysal Quick Plus Plate	Greiner Bio One, Kremsmünster, AUT
CFX96 qPCR™ Real-Time PCR Detection System	BioRad, München, DEU
Dyna Pro Nanostar	WYATT, Dernbach, DEU
Ecotron	Infors HT, Bottmingen, CHE
Elektrophoresis System Easy-Cast	BioRad, München, DEU
Heizschüttler	HLC Biotech, Bovenden, DEU
HiLoad® 16/60 Superdex® 200 pg	GE Healthcare, Solingen, DEU
Kulturröhrchen 13ml	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Leica M205 C	Leica, Biberach, DEU
Mosquito® Crystal	TTP Laptech, Hertfordshire, UK
Multitron	Infors HT, Bottmingen, CHE
Nanodrop 2000	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
OD600	Implen, München, DEU
pH Meter	Ino Lab WTW, Weilheim, DEU
Power Pac Universal	BioRad, München, DEU
RC 12 BP	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
SDS-Page Elektrophorese System	BioRad, München, DEU
Synergy HT/H4	Biotek, Bad Friedrichshall, DEU
TC-3000	Techne, Chelmsford, ENG
Tecan Genios Pro Platereader	Tecan, Männedorf, CHE
Ultrazentrifuge XL-70	Beckman Coulter, Krefeld, DEU
Ultrospec 2100 pro	Biosciences, Heidelberg, DEU
UVette	Eppendorf, Hamburg, DEU
Vibra Cell	Sonics & Materials, Newtown, CT, USA
Vivaspin 20 10k /30k	Sartorius, Göttingen, DEU

Waage	Kern, Balingen-Frommern, DEU
Wasserbad	Julabo, Seelbach, DEU
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, DEU
Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, DEU
Zentrifuge Hareaus X1R	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

4.2 Methoden

4.2.1 Klonierung

Mittels PCR werden die Konstrukte eIF4A-Myc (NdeI/EcoRI) und eIF4GICD-HA (NheI/ EcoRI) hergestellt. Für die Verkürzung von eIF4GICD(1426) werden über die Restriktion Enzyme NheI/XhoI in den Vektor eingefügt. Die Konstrukte von eIF4A(G70C/R367C) (NdeI/EcoRI) werden bei Genart bestellt. Alle erstellten Konstrukte werden in pET28a ligiert und sind im Anhang 8.4) aufgeführt. Dieser Expressionsvektor pET28a enthält einen N-terminalen Polyhistidin-Tag (His₆), der eine Spaltungstelle für Thrombin besitzt.

Das Konstrukt von eIF4GMD (710-1056) wurde von Patrick Schütz [37] hergestellt. Der Expressionsvektor pGEX-6P-1 enthält einen N-terminalen GST-Tag und besitzt eine Spaltungstelle für *Human Rhinovirus* 3C-Proteasen.

Die Konstrukte eIF4A und eIF4GICD(1572) wurden von Renato Baumgartner hergestellt.

4.2.2 Rekombinante Expression von eIF4A und eIF4GI

Für alle eIF4A-Konstrukte wurden Übernachtskulturen der Expressionszellen *E. coli* BL21 (DE3) mit dem Expressionsvektor pET28a in 100 ml LB-Medium (10 g Hefeextrakt, 10 g Natriumchlorid, 5 g Trypton, 500 µl 1 M NaOH-Lösung, 1000 ml) mit 50 µg/ml Kanamycin angeimpft und bei 37 °C und 220 Umdrehungen pro Minute auf einem Orbitalschüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurden jeweils 10 ml der Übernachtskultur in 2 l Erlenmeyerkolben mit 1000 ml LB-Medium und 50 µg/ml Kanamycin überführt und weiter inkubiert, bis eine OD_{600nm} von 0.6 erreicht wurde. Um die Proteinproduktion zu induzieren, wurden in der Folge 500 µl einer 1 M IPTG-Lösung hinzugegeben, die Temperatur auf 20 °C eingestellt und die Lösung weitere 15 Stunden inkubiert.

Für alle eIF4GCD-Konstrukte (Expressionsvektor pET28a) wurde die rekombinante Expression im Wesentlichen gleich durchgeführt. Verwendet wurde jedoch das Auto-induktionsmedium (928 ml ZY-Medium: 5 g Hefeextrakt, 10 g Trypton, 50 ml 20fache NPS-Lösung (1 M KH_2PO_4 , 1 M Na_2HPO_4 und 0.5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) und 20 ml 5052-Lösung (0.5 % (w/v) Glycerin 0.05 % (w/v) Glucose, 0.2 % (w/v) α -Laktose und 2 mL 1 M Magnesiumsulfat) verwendet [78]. Nach drei Stunden wurde die Inkubationstemperatur von 37 °C auf 20 °C gesenkt, und die Inkubation wurde für weitere 19 Stunden fortgeführt.

Für eIF4GMD (710-1056) wurde auf dieselbe Weise verfahren mit der Ausnahme, dass der Expressionsvektor pGEX-6P-1 war und daher statt Kanamycin 100 µg/ml Ampicillin im LB-Medium verwendet wurde.

Anschließend wurden die Kulturen in 1000 ml Zentrifugenbecher überführt und bei 4000 g für 20 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. Jedes Pellet wurde anschließend in 50 ml eiskaltem Aufschlusspuffer (300 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 8; 10 mM Imidazol) resuspendiert und vereinigt und erneut bei 4000 g für 15 Minuten lang bei einer Temperatur von 4 °C abzentrifugiert. Die Pellets wurden, wenn nicht gleich weiter verarbeitet, bei -80 °C eingefroren.

4.2.3 Zellaufschluss

Für den Ausschluss wurde die Masse des jeweiligen Zellenpellets bestimmt und nach Berechnung mit 4mL * x g Zellpellets mit dem entsprechenden Volumen an Aufschlusspuffer (300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM Imidazol) mit einer Tablette Protease-Inhibitorgemisch (cOmplete, EDTA-free, Roche Life Science) resuspendiert und mittels Ultraschall aufgeschlossen (40 % Amplitude 2min 2sec Plus). Die aufgeschlossenen Zellen wurden bei 4 °C und 8000 g 30 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit Filterpapier von Resten der Zelltrümmer befreit und zur Reinigung der Proteine verwendet.

4.2.4 Affinitätschromatographie

Nickel-Chelatchromatographie

Ni-NTA-Harz (Resin) wurde durch Äquilibrieren mit dem Aufschlusspuffer von 20 % Ethanol befreit. Nach Zugabe des Resins zum Rohlysat erfolgte für 40 Minuten die Bindung durch behutsames Schwenken bei 18 rpm bei 4°C. Die Dispersion wurde auf eine Glassäule mit Fritte aufgetragen, wodurch das Harz in der Säule verblieb und das übrige Rohlysat die Säule

passierte. Letzteres wurde als „Durchlauf“ bezeichnet. Zur Abtrennung von nicht gebundenem Fremdprotein folgten mehrere Waschschriffe.

Als erstes wurde die Säule mit dem 15-fachen des Säulenvolumens mit Aufschlusspuffer gewaschen. Anschließend wurde das Säulenmaterial mit dem Dreifachen des Säulenvolumens mit Waschpuffer (300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5 30 mM Imidazol) gewaschen. Mit 20 ml des Elutionspuffers (300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0 250 mM Imidazol, 2 mM TCEP) wurde das Protein vom Säulenmaterial eluiert. Von jeder Fraktion wurden Aliquote zur späteren Überprüfung für die SDS-PAGE entnommen.

Gluathion Affinitätschromatographie

Das Rohlysat wird mittels Batchverfahrens, wie für Ni-NTA beschrieben, an die Gluathion-Sperarose gebunden. Gluathion-Sperarose 4B wird mit dem Aufschlusspuffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 8, 4 mM DTT) äquibriert. Anschließend wird das Rohlysat über die Säule gegeben und mit 10-fachem Säulenvolumen mit dem Aufschlusspuffer gewaschen. Mit dem Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 9.6, 10 mM reduziertes Glutathion (GSH)) wird 10 Minuten inkubiert und eluiert. Von jeder Fraktion werden Aliquot zur späteren Überprüfung für die SDS-PAGE entnommen.

4.2.5 Affinitätstagentfernung mittels Thrombin / *Human Rhinovirus* 3C-Proteasen

Vom Eluat wurde die Proteinkonzentration (mg/ml) bei 280 nm bestimmt. Für den Verdau von eIF4A/eIF4GCD wurde eine Thrombin-Lösung (*Sigma Aldrich*) von 1Unit/ μ l angesetzt. Die Eluate von eIF4A/eIF4GCD wurden mit der entsprechenden Proteinmenge pro Unit von Thrombin versetzt (1U Thrombin/Protein mg). Der Thrombinverdau wurde über Nacht bei 4°C während der Dialyse (3.5-5.0 kDa Ausschlussgröße) in einem Puffer bestehend aus 100 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5, 1 mM TCEP durchgeführt.

Für den Verdau von GST-eIF4GMD wurde das Fusionsprotein mit der rekombinant hergestellten HRV3C (10 mg/ml)-Protease versetzt (10 μ l HRV3C/Protein mg) und mit 18 rpm auf dem Schwenktisch bei 4°C für 12 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Protein über das jeweilige Säulenmaterial gegeben, um es von dem überschüssigen GST-Tag zu befreien. Die Effizienz des Verdaus wurde mittels SDS-Page und Western Blots mit den Antikörpern Anti-Penta His/ Anti GST-Tag überprüft.

Für den TR-FRET-Assay wurden keine weiteren Aufreinigungsmethoden verwendet. eIF4A

wurde im Puffer 100 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM TCEP mit 20 % Glycerol versetzt und bei -80 gelagert. eIF4GICD(1572) konnte im Puffer 150 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl pH 7.5; 4 mM DTT bei -80 °C gelagert werden, und eIF4GICD(1426) konnte im Puffer (150 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM DTT) bei 4°C gelagert werden.

4.2.6 Gel-Permeations-Chromatographie

Die Analyse der Komplexbildung wurde mittels Gel-Permeations-Chromatographie durchgeführt. Hierfür wurde die Säule *HiLoad® 16/60 Superdex® 200 pg* (GE Healthcare) verwendet. Diese wurde mit 150 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl; pH 7,5 äquilibriert und mit Cytochrom C (12 kDa), Hexokinase (45 kDa), BSA (66,4 kDa), Katalase (240 kDa) und Ferritin (440 kDa) kalibriert.

4.2.7 Konzentrierung der Proteine durch Ultrazentrifugation

Die ersten drei Elutionsvolumen-Fractionen von den Komplexen eIF4A:eIF4GICD(1572) und eIF4A:eIF4GICD(1426) wurden mit der Methode der Ultrazentrifugation konzentriert.

Die Proteine wurden mit Ultrafiltrationsröhrchen der Firma *Sartorius* mit einer Ausschlussgröße von 10.000-30.000 Da konzentriert und in den 50 mM Tris-HCl; pH 7,5 1-4 mM DTT-Puffer überführt. Dies erfolgte bei einer Zentrifugation von 4000 g bei 4 °C.

4.2.8 Kristallisation

Für die Kristallisation wurde für den Komplex eIF4A:eIF4GICD(1572) die Konzentration von 5-20 mg/ml verwendet und anschließend bei 13000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Für den Komplex eIF4A:eIF4GICD(1426) wurde genauso fortgefahren. Anschließend werden die Kristallisationsplatten (TTP-Platten, *TTP Labtech*) mit dem jeweiligen Kristallisationsscreen befüllt und auf 4 °C, 16 °C und 20 °C vorinkubiert.

4.2.8.1 Kristallisation mit Vapor Diffusion

Die Proben werden mittels *Mosquito®* Crystal auf die TTP Sitting Drop-Platten im Tropfenverhältnis von 100:100, 200:100, 300:100 verteilt und bei 4-20 °C inkubiert. Hierfür werden die folgenden Kristallisationsscreens (Tab.4.5) benutzt:

Tabelle 4.5 Kristallisationsscreen

Kristallisationsscreen	Hersteller
PEG/Ion HT	Hampton Research, Aliso Aiejo, CA, USA
PACT Premie	Molecular Dimensions, Newmarket, UK
Index HT	Hampton Research, Aliso Aiejo, CA, USA
Wizard I&II	Jena Bioscience, Jena, DEU
SaltRX HT	Hampton Research, Aliso Aiejo, CA, USA
Crystal HT	Hampton Research, Aliso Aiejo, CA, USA
JCSG plus	Molecular Dimensions, Newmarket, UK
MIDAS	Molecular Dimensions, Newmarket, UK
Morpheus	Molecular Dimensions, Newmarket, UK
Natrix	Hampton Research, Aliso Aiejo, CA, USA
Sigma for Complexes	Sigma-Aldrich, München, DEU
Low ionic strength screen	Hampton Research, Aliso Aiejo, CA, USA
Additives Screen I, II, III	Hampton Research, Aliso Aiejo, CA, USA

Cryo Bedingungen:

Alle Cryo-Bedingungen sind in Tabelle 4.6 dargestellt.

Tabelle 4.6: Cryo-Bedingungen

Bedingungen	Cryo Bedingungen
0.2M Ammoniumacetat 0.1M BIS-TRIS pH 5.5 25 % (v/w) PEG 3350	0.2M Ammoniumacetat 0.1M BIS-TRIS pH 5.5 25 % (v/w) PEG 3350, 30 % (w/v) Saccharose
0.2M Ammoniumacetat 0.1M BIS-TRIS pH 5.5 25 % (v/w) PEG 3350, 4 % (v/v) Dichlormethan	2 % (v/v) Tacsimat, 0.1M HEPES pH 7.0, 20 % PEG 3350, 4 % (v/v) Dichlormethan, 30 % (w/v) Glycerol
2 % (v/v) Tacsimat, 0.1M HEPES pH 7.0, 20 % PEG 3350	2 % (v/v) Tacsimat, 0.1M HEPES pH 7.0, 20 % PEG 3350, 40 % (w/v) Glycerol
8 % Tacsimat (v/v), pH 6.0, 20 % (v/w) PEG 3350	8 % Tacsimat (v/v), pH 6.0, 20 % (v/w) PEG 3350, 40 % (w/v) Glycerol

1 M Natriumcitrat	100 mM Tris (pH 7)	1 M Natriumcitrat	100 mM Tris (pH 7)
200 mM Natriumchlorid		200 mM Natriumchlorid,	30 % (w/v)
		Saccharose	

Diese Cyro-Bedingungen (Tab 4.6) werden an Rigaku/Oxford-Cryostream getestet.

Seeding:

Hierfür wird ein Nadelcluster aus der Bedingung gefischt. Diese Kristalle werden mit dem Kristallisationspuffer gewaschen. Anschließend wird der Nadelcluster mit einer Nadel zerstört und mit 10 µl Kristallisationspuffer vermischt, damit ist der Seedstock entstanden. Von diesem Seedstock werden die folgenden Verdünnungen angesetzt: 1:500, 1:1000, 1:5000.

Bei dem Seeding werden Platten angesetzt und eine bis zwei Stunden äquilibriert und anschließend werden 50 nl der Seedstockverdünnungen in die Tropfen gegeben und bei 4°C und 20 °C inkubiert.

4.2.8.2 CrystalHarp™

CrystalHarp™ (Molecular Dimensions) wird als Screening-Methode für die Methode des Counter Diffusion genutzt. *CrystalHarp™* besteht aus 48 Kapillaren. 22-25 µl der Proteinlösung wurden in die untere Proteinbeladungsöffnung der *TM™* gefüllt. An die obere leere Proteinbeladungsöffnung wurde leichtes Vakuum angelegt, wodurch die Proteinlösung langsam durch die Kapillare gezogen wurde; dieses sollte unter dem Mikroskop beobachtet werden. Anschließend wurden die Kapillaren an der entsprechenden Stelle zerbrochen und mit Dichtungsmasse überschichtet. 20 µL von der Kristallisationsbedingung wurde in die zugehörige Öffnung gefüllt und die Kapillare an dieser Öffnung zerbrochen und mit Paraffinöl überschichtet. Die *CrystalHarp™* wurde mit dem Kristallisationsscreen für Protein-Protein-Interaktionen (*Sigma Aldrich*) bei 4-20 °C angesetzt.

Vorbereitung der Kapillaren für Raumtemperaturmessungen:

Die zerbrochene Kapillare wurde an einem Ende mit Wachs verschlossen und das andere Ende mit Sekundenkleber an dem Metallrohr des Magnetfußes befestigt. Anschließend wurde der Magnetfuß auf den Goniometerkopf gesetzt und die Messung gestartet.

Die *CystalHarp™*-Bedingungen wurden am Paul Scherrer Institut an der Swiss Light Source (SLS) (Villigen, Schweiz) mittels eines Roboters für Platten vermessen.

Vorbereitung der Kapillaren für Messungen unter cryogenen Temperaturen:

Die zerbrochene Kapillare wurde an einem Ende mit einer kleinen Menge Wasser an das Metallrohr des Magnetfußes befestigt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde der Magnetfuß auf den Goniometerkopf gesetzt und die Messung gestartet.

4.2.9 Differential scanning fluorimetry

Mithilfe der Methode der *Differential Scanning Fluorimetry (DSF)* bzw. des ThermoFluor Assays kann die Schmelztemperatur von Protein in verschiedenen Puffern bestimmt werden. Der Fluoreszenzfarbstoff *SYPRO® Orange Protein Gel Stain (Sigma-Aldrich)* hat die Eigenschaft, an den hydrophoben Regionen von Proteinen zu binden, was zu einer Fluoreszenzerhöhung führt. Durch das Erhitzen und Denaturieren der Proteine werden diese Regionen zugänglich, und es kann eine Zunahme der Fluoreszenz gemessen werden.

Für die Anwendung von DSF in der vorliegenden Arbeit wurde ein Masterblock mit verschiedenen Zweifachpuffern hergestellt. Die SYPRO® Orange-Stocklösung wurde 50-fach verdünnt mit Wasser/oder Puffer der Wahl. 40 µL der Puffer wurden in die 96-Well-Platten vorgelegt. 5 µL von 5-10 µM Proteinlösung wurden mit 5 µL SYPRO® Orange-Lösung an den Rand der 96-Well-Platten gegeben. Diese Platten werden bei 500 g abzentrifugiert. Danach wurden die Platten im CFX96 qPCR™ Real-Time PCR Detection-System (*BioRad*) platziert und stufenweise von 4 °C mit 1 °C / Minuten auf 95 °C erhitzt.

4.2.10 Aktivitätstest EnzChek® Phosphat Assay Kit

Bei der RNA-abhängigen ATP-Helikase sowie den Komplexen, in denen sie enthalten ist, wurde die ATPase-Aktivität mit dem EnzChek® Phosphate Assay Kit (*Life Technologies*) bestimmt (Abb. 4.1). Dieser ATPase-Assay ist ein Enzym-gekoppelter Assay. Bei der Separierung von mRNA wird das ATP zu ADP und Phosphat hydrolysiert. Durch dieses Phosphat ist das Enzym Purin-nukleosid-Phosphorylase (PNP) in der Lage, das Substrat 2-Amino-6-mercapto-7-methyl-purin-Ribosid (MESG) zu phosphorylisieren. Die resultierenden Produkte sind das Ribose-1-Phosphat und das 2-Amino-6-mercapto-7-methyl-Purin, welches ein Absorptionsmaximum bei 360 nm aufweist. Durch die Bildung des Phosphats resultiert

die Bildung 2-Amino-6-mercapto-7-methyl-Purin, was einen Anstieg der Absorption bei 360 nm zur Folge hat.

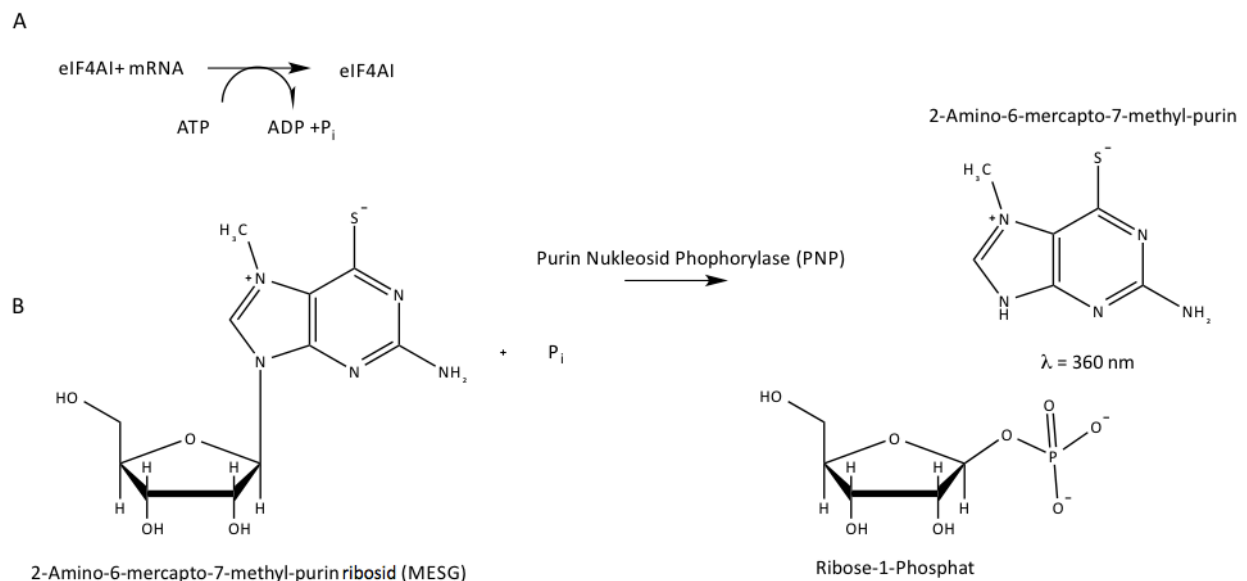


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung des Enzym-gekoppelten EnzChek® Phosphat-Assay, A: aus eIF4A mit ScRNA entsteht Phosphat und ADP aus ATP. B: Das Substrat 2-Amino-6-mercapto-7-methyl-purin ribosid (MESG) wird in Anwesenheit von Phosphat durch das Enzym Purin-nukleosid-Phosphorylase (PNP) in Ribose-1-Phosphat und 2-amino-6-mercapto-7-Methylpurin ($Abs_{max} = 360 \text{ nm}$) gespalten [79].

Die Zusammensetzung des Assays wurde von 1000 μL auf das finale Volumen von 300 μL herunterskaliert, um es für 96-Well-Platten einzusetzen. Die Zusammensetzung des Reaktionsgemischs für ein Well war 218 μL -x Wasser, 15 μL 20x Reaktionspuffer (50 mM Tris pH 8.0, 0.02 % Natriumazid), 60 μL MESG, 3 μL PNP und 10 μL Hefe RNA (10 mg/ml) und x μL Protein (x entspricht eIF4A /eIF4GI). Diese Komponenten wurden gemischt und bei 22°C für 20 Minuten inkubiert. Zum Reaktionsansatz wurden 4 μL ATP-Lösung (50 mM ATP, 100 mM MgCl_2) hinzugefügt und gemischt. Die Zunahme der Absorption wurde über einen Zeitraum von vier Stunden in Platerader Synergy HT/H4 bei 22°C gemessen.

4.2.11 Oberflächenentropie-Reduktionsmutanten

Mit der nachfolgenden Methode wird die Entropie der Proteinoberfläche reduziert, um eine Verbesserung der Kristallisation des jeweiligen Proteins zu erhalten.

Zum Design der Oberflächenentropie-Reduktionsmutanten [80] wurden die Aminosäuresequenzen des jeweiligen Proteins auf der Homepage <http://services.mbi.ucla.edu/SER/> eingegeben. Dort eingegebene Sequenzen durchlaufen mehrere Analysen. Bei der ersten wird der PSIPRED-Server durchlaufen, der eine Vorhersage zur Sekundärstruktur des Proteins macht. Gleichzeitig wird ein PSI-BLAST-Algorithmus angewendet. Durch die

Vorhersage der Sekundärstruktur werden unstrukturierte Bereiche des Proteins erkennbar. In diesen Bereichen werden die Aminosäuren nach der Seitenketten-Entropie Tabelle [81] eingestuft, in der Glutaminsäure den höchsten Wert hat. Der nächste Schritt ist die Bildung von Clustern dieser Aminosäuren. Die Einstufung der Cluster beginnt mit demjenigen Cluster, das den höchsten Entropiewert aufweist, viele Aminosäuren wie Glutaminsäure, Glutamin und Lysin enthalten. Anschließend werden die Cluster herausgegeben, die den höchsten Entropiewert haben, und es wird derjenige Entropiewert angegeben, der bei der Mutierung der Cluster zu Alanin erzielt wird, wodurch eine Reduktion der Entropie der Proteinoberfläche erzielt wird.

Bei der Methode der Oberflächenentropie-Reduktion (*Surface Entropy Reduction, SER*) werden die durch die Analyse gewählten Cluster flexibler Aminosäuren wie Lysin, Glutaminsäure und Glutamin zu Alanin mutiert, um die Reduktionsmutanten zu erhalten. Es sollte nur ein Cluster pro analysiertem Protein ausgetauscht werden, da sonst für den Fall, dass alle Aminosäuren zu Alanin ausgetauscht werden, keine Gewährleistung für lösliche Expression vorhanden ist. Die Mutanten wurden parallel über Homologie zu anderen Isoformen von eIF4GICD und eIF4AI ausgesucht. Alle Mutanten wurden mittels PCR synthetisiert (Tab. 4.7).

Tabelle 4.7: Lister der Primer für die Reduktionsmutanten-PCR

eIF4GICD	
1 Cluster:	Fw: ACCCTGGGTGCAGCAAGCGAAGCTCCTGGTCAA
E1428A/E1430A/E1432A	Rev: GAGCTTCGCTTGCTGCACCCAGGGTATACTCCAC
2 Cluster:	Fw: TGTGACGCACAGACAGCACTGCAAGCCCTGTATGCA
E1519A/K1521T/E1522A	Rev: GGCTTGCAAGTGCTGTCTGTGCGTCACACAGATATTTTTG
3 Cluster:	Fw: GTGGTGGCAGCAGATGCCTTTTATTCCTGGGAA
K1557A/E1558A	Rev: GGCATCTGCTGCCACCACATCCTCATCATA
eIF4A	
1 Cluster:	Fw: ATTCGGATTCTTGTGCGGATAGACGCGTTGACC
K261A/K262I/E263D/E264A	Rev: ACCCTCCAGGGTCAACGCGTCTATCGCGACAAG
2 Cluster:	Fw: ATCAACGTGGAACGAACTCGTGGAGGCTGGAC
E280N/E281S/W282W/K283R	Rev: ACATAGTGTGTCCAGCCTCCACGAGTTTCGTTT

3 Cluster:	Fw: ATGCATGGAGATATGGACCACTCGGCACGAGAC
Q332H/K333S/E334A	Rev: CATAATCACGTCTCGTGCCGAGTGGTCCAT

4.2.12 Bio-Layer-Interferometrie (BLI)

Mit der Bio-Layer-Interferometrie (BLI) [82] können Proteininteraktionen (Protein-Protein, Protein-Peptide, Protein DNA/RNA) untersucht werden. BLI hat eine Liganden-Begrenzung von 10 kDa, kleinere Liganden zeigen keine Veränderung des Signals.

Bei der BLI in der vorliegenden Arbeit wurde ein Chip verwendet, der mit Ni-NTA überzogen war. An diesem Chip wurde His-eIF4GCD gebunden, wodurch es zum Liganden wurde. Dieser Vorgang wird auch als Beladung bezeichnet und ist in Abbildung 4.2 erkennbar. Hierzu wurden 4 µl von eIF4GICD-His in den Tropfenhalter geben und der Deckel des Gerätes geschlossen. Nach der Beladung erfolgte die Aufzeichnung der Basislinie; hierzu wurde der Bio-Sensoren in den Reaktionspuffer im Reaktionsgefäßhalter getaucht. Es wurden nur 4 µl von eIF4A in den Tropfenhalter gefüllt, und die Assoziation wurde für 120 Sekunden aufgenommen. In sofortigem Anschluss wurde der Bio-Sensoren in den Reaktionspuffer gegeben und die Dissoziation aufgenommen. Diese Vorgehensweise wurde mit den Konzentrationen 1.2-0.075 µM zweimal durchgeführt.

Regeneration des Chips:

Nach jeder Assoziation/Dissoziation werden dreimal die Schritte mit 1 M Glycin, pH 1.2, in Abwechslung mit Puffer, pH 8, durchgeführt. Anschließend wird der Biosensor mit 0.5 M NiCl₂ für 30 Sec und mit Puffer behandelt.

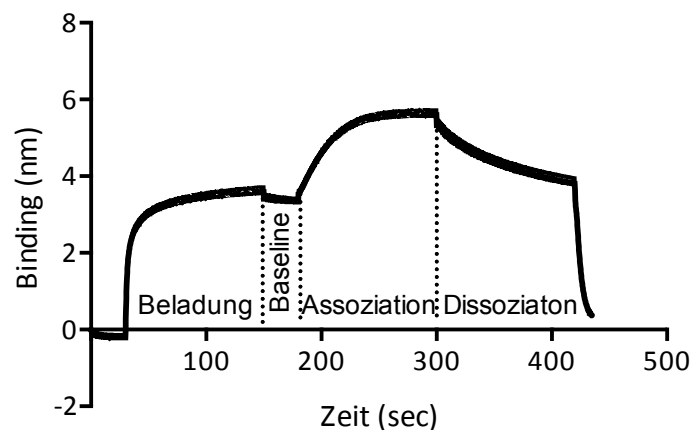


Abbildung 4.2: Theoretischer Verlauf einer BLI-Messung

Mit den folgenden Formeln werden die Assoziationskonstante und die Dissoziationskonstante der Bindungskurven bestimmt. Der hier verwendete Fit ist ein 1:1.

Assoziation :

$$y = y_0 + A(1 - e^{-k_{obs} \cdot t})$$

Formel 4.1

$$k_a = \frac{k_{obs} - k_d}{[Analyt (M)]}$$

Formel 4.2

Dissoziation:

$$y = y_0 + Ae^{-k_d \cdot t}$$

Formel 4.3

Die Dissoziationskonstante K_D wird aus der Formel 4.4 ermittelt.

$$K_D = \frac{k_d}{k_a}$$

Formel 4.4

4.2.13 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Die Durchführung der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) wurde von Andreas Oder vom Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Screening Unit FMP durchgeführt. Diese Messung sollte einen Vergleich der NaCl-Abhängigkeit von eIF4A:eIF4GICD ermöglichen.

Hierfür wird der Biosensor Ni-NTA verwendet. Also wird eIF4GICD an den Ni-NTA-Chip gebunden und ist somit der Ligand. Als Analyt wird eIF4A-myc in der Konzentration 3-24 nM eingesetzt. Die Flussrate beträgt 30 µl/min. Es folgen die Messungen mit dem Puffer 30 mM NaCl/150 mM NaCl; 50 mM HEPES pH 7.5; 0,05 % (v/v) Tween; 0,05 % BSA. Der Experimentverlauf entspricht dem der Bio-Layer-Interferometrie (BLI). Für den Fit der Bindungsdiagramme werden die gleichen Formeln verwendet.

4.2.14 HTR-FRET-Methode

Zur Durchführung eines homogenen TR-FRET (HTR-FRET) werden Antikörper der Firma *Cisbio BioAssays* genutzt. Als Donor-Antikörper werden in dieser Arbeit das Tris-bipyridin Eu^{3+} -Kryptat (Eu-Antikörper) und *Lumi 4®*-Tb-Kryptat (Tb-Antikörper) verwendet. Für beide Donor-Antikörper gelten Anregungswellenlängen von 330-340 nm und eine Emissionswellenlänge von 620 nm.

Für den Komplex eIF4A:eIF4G1CD werden die Donor-Antikörper Eu(K)-HA, Tb-His und die Akzeptor-Antikörper von XL665-Myc verwendet, während für den Komplex eIF4A:eIF4GMD der Donor-Antikörper Eu(K)-His und der Akzeptor-Antikörper von XL665-GST eingesetzt werden.

Antikörper-Vorbereitung:

Die Antikörper (5000 Reaktionen, 20000 Reaktionen) wurden in lyophilisierter Form von *Cisbio Assays* geliefert. Es wurde die entsprechende Menge destilliertes Wasser (400 µg/µL) dazugegeben und gemischt. Danach wurden die Antikörper in verwendbare Aliquote aufgeteilt. Alle Protein- und Antikörperlösungen werden in Assay-Puffer angesetzt.

Titration HTR-FRET-Assay:

Die Protein-Stocklösungen wurden mit einem Assay von 4000 nM angesetzt (finale Konzentration 1000 nM). Diese Proteinlösung wurde 1:2 verdünnt bis zu einer finalen Konzentration von 3,5 nM. Die Antikörper wurden in 2-facher Konzentration angesetzt und zusammengemischt. Jeweils 5 µl der Proteinlösungen wurden nach dem folgenden Schema (Tabelle 4.8) zusammenpipettiert, und 10 µL wurden in eine 384-Well-Low-Volume-Platte (*Greiner bio-one*) pipettiert. In der Folge wurden jeweils 10 µl des Antikörper-Gemischs allen Spalten hinzugefügt, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und am Synergy H4 ausgelesen.

Tabelle 4.8: Pipettierschema für die Titration

eIF4G	1000 nM	500 nM	250 nM	125 nM	0 nM
eIF4A	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL
1000 nM	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL
500 nM	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL
250 nM	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL
125 nM	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL
0 nM	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL	5 µL/5 µL

Kompetitiver HTR-FRET-Assay:

Finale Konzentrationen in Assay:

31,25 nM eIF4A-Myc

31,25 nM eIF4GICD-His

1:400 Antikörper-His-Tb

1:400 Antikörper-Myc-XL665

10 µM chemische Verbindung

Assay Puffer : 50 mM Hepes pH 7.5 , 30 mM NaCl, 0.05 % (v/v) Tween 20 , 0.1 % (v/w) BSA

Kontrollen:

Die Positivkontrolle enthielt beide Proteine und beide Antikörper; die Lokalisierung auf der Platte war Spalte 23. Die negative Kontrolle enthielt eIF4GICD-His und beide Antikörper; diese Proben befanden sich in Spalte 24.

Durchführung:

Der HTR-FRET-Assay wurde am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie, Screening Unit FMP vom Andreas Oder durchgeführt; das entsprechende Protokoll wurde auch für den Pilotscreen und den primären Screen sowie für die Validierung benutzt. Bei der Validierung wurden die chemischen Verbindungen 50-0.3 µM verdünnt. Für jede Verdünnungen der chemischen Verbindungen wurde eine Platte gemessen.

eIF4A-Myc wurde in der Konzentration in 125 nM in Assay-Puffer angesetzt. Von dieser Lösung wurden 5 µl in alle Spalten außer in Spalte 24 gegeben. eIF4GICD-His wurde mit den beiden Antikörpern in zweifacher finaler Konzentration angesetzt. Die Lösung wurde zu jeweils 10 µl in allen Spalten dispensiert. Von den chemischen Verbindungen wurden 0.2 µl in die Spalten 1-22 gefüllt. Die Platte wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und am *Tecan Genios Pro Platereader* ausgelesen.

Auswertung:

Bei diesem Assay-System wurde die Fluoreszenz des Donors (620 nm) und des Akzeptors (665 nm) gemessen und aus den erhaltenen Messwerten das HTR-FRET-Verhältnis (R) gebildet:

$$R = \frac{\text{Akzeptors (665 nm)}}{\text{Donor (620 nm)}}$$

Formel 4.5

Um die gemessenen Werte besser vergleichen zu können, wurde das Signal/Hintergrund-Verhältnis gebildet. Das S/B-Verhältnis entspricht in diesem Fall auch dem Assay-Fenster (Abschnitt 2.1). Hierzu wurden die Daten wie folgt ausgewertet:

$$\frac{S}{B} \text{ Verhältnis} = \frac{R (\text{Messwert})}{R (\text{Hintergrund})}$$

Formel 4.6

Bei der Hintergrundmessung wurde immer der Mittelwert aus den negativen Proben genommen. Für die Negativprobe wurde eines der beiden Proteine allein sowie die beiden Antikörper wie die aktive Probe behandelt.

Auswertung des kompetitiven HTR-FRET:

Zur Ermittlung der relativen Aktivität wurde von den Messwerten der Hintergrund subtrahiert. Dieser Wert wurde dann als R gesetzt. Anschließend wurde die relative Aktivierung wie folgt bestimmt:

$$\text{relative Aktivität} = \frac{R_{Co-c1000 \text{ nM}}}{R_{Co}}$$

Formel 4.7

Damit werden die Daten auf 1 normiert.

Bestimmung des z-Faktors und Bestimmung des Z-Scores:

In der Etablierungsphase des Assays wurde die Homepage des FMP genutzt, um den z-Faktor zu bestimmen: <http://www.screeningunit-fmp.net/tools/z-prime.php>.

Beim Primärscreen wurde der z-Faktor dann wie folgt bestimmt, wobei der Standardabweichung ein Faktor von 1,48258 multipliziert wurde. Dieser Faktor kommt durch die Verwendung des Medians zustande. Der Median ist in der Statistik ein Zentralwert (mittlere Zahl 1,1,2,3,18, die Zahl 2 wäre hier der Median) für Normalverteilungen. Die Standardabweichung des Medians (*Median Absolute Deviation*, MAD) muss mit einem

Skalierungsfaktor von 1,48258 versehen werden, da das 1,4826-fache des MAD in großen Proben der Normalverteilung der normalen Standardabweichung entspricht.

Aus diesem Grund wurden die folgenden Gleichungen verwendet.

$$z - \text{Faktor} = 1 - \frac{3 * 1.48258 (MAD_{pos. \text{ Kontrolle}} + MAD_{neg. \text{ Kontrolle}})}{Median_{pos. \text{ Kontrolle}} - Median_{neg. \text{ Kontrolle}}}$$

Formel 4.8

$$Z - \text{Score} = \frac{Messwert - M_{Messwert}}{1.48258 * SD_{Messwert}}$$

Formel 4.9

5 Ergebnisse

Die nachfolgenden Ausführungen präsentieren zunächst die Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen. Diese befassen sich mit der regulatorischen C-terminalen Domäne (eIF4GICD) des Ankerproteins eIF4GI in der Interaktion mit eIF4AI aus dem Organismus *Homo sapiens*.

Der zweite Teil der Ergebnisse befasst sich mit der Entwicklung eines homogenen TR-FRET-Assays für den Komplex eIF4A:eIF4GICD und den Komplex eIF4A:eIF4GMD. Für den Komplex eIF4A:eIF4GICD wurde ein Hochdurchsatz-Screening (HTS) am Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) in Berlin durchgeführt, dessen Ergebnisse ebenfalls (Abschnitt 5.10) dargestellt werden.

5.1 Komplex-Bildung von eIF4AI:eIF4GICD(1572)

Der Komplex von eIF4AI:eIF4GICD(1572) wurde aus der Aufreinigung der einzelnen Komponenten gewonnen. Hierzu wurden eIF4AI und eIF4GICD(1572) jeweils einzeln mit einer Nickel-Affinitätschromatographie angereichert. Aus dieser Anreicherung von eIF4AI und eIF4GICD(1572) wurde bei einem molekularen Verhältnis von 1:1,5 die Komplexbildung bei 4°C durchgeführt (siehe Kapitel 4.2.6). Um den Überschuss von eIF4GICD(1572) abzutrennen, wurde eine Gel-Permeations-Chromatographie (Superdex 200 16/60) durchgeführt.

Das Chromatogramm (Abb. 5.1) lieferte für den Komplex (eIF4AI:eIF4GICD) ein Elutionsvolumen von 68ml. eIF4GICD (1572) zeigte ein Elutionsvolumen von 76 ml. Aus der SDS-Page-Analyse wurde ein Verhältnis von 1:1 für den Komplex ersichtlich. Aus der Kalibrierungsgeraden konnte eine molekulare Masse von ca. 76 kDa ermittelt werden.

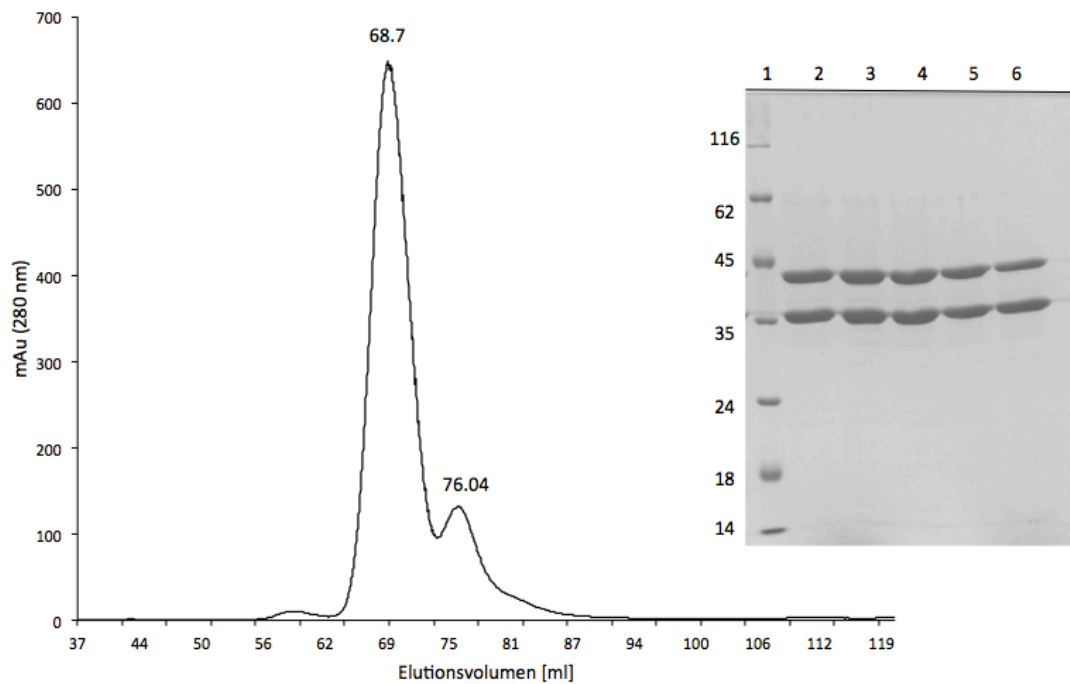


Abbildung 5.1: Elutionsprofil: Komplexbildung eIF4AI:eIF4GICD(1572). Das Elutionsvolumen von 68.7ml entspricht dem Komplex und das Elutionsvolumen von 76 ml entspricht eIF4GICD(1572). SDS Page: Spur 1: Unstained Protein Marker (kDa) Spur2-5 sind die Fraktionen des Elutionsvolumens von 68.7ml eIF4AI: M_w von 42kDa, eIF4GICD(1572): M_w von 35kDa.

Mit den erhaltenen Fraktionen wurde die dynamische Lichtstreuung gemessen. Die Fraktionen zeigten eine durchschnittliche Monodispersität von 5 %; für den Radius betrug der Mittelwert 4.7 nm. Die Fraktionen wurden eingeeengt, wonach die Monodispersität 17 % betrug. Dieser Komplex wurde mittels Ultrazentrifugation auf eine Konzentration von 5-15 mg/ml aufkonzentriert und für das Kristallisationsexperiment verwendet (siehe 5.5.1).

5.1.1 Differential Scanning Fluorimetry (DSF)

Mittels *Differential Scanning Fluorimetry* (DSF, auch *Thermofluor* genannt) wurde die Stabilität von eIF4AI, eIF4GICD und des Komplexes untersucht. Bei dieser Bestimmung wurden Puffersubstanzen gefunden, in denen sowohl die Einzelkomponenten eIF4AI und eIF4GICD als auch der Komplex eine erhöhte Schmelztemperatur zeigten (Abb. 5.2).

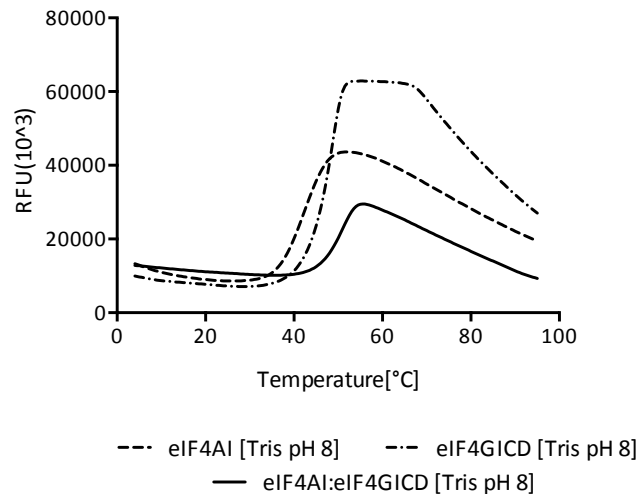


Abbildung 5.2: Darstellung der Schmelzkurven relative Fluoreszenz Unit (RFU 10^3) gegen die Temperatur. Beschreibung: Vergleich der Schmelzkurven von eIF4A, eIF4GICD(1572) und eIF4A:eIF4ICD(1572) im Puffersystem Tris-HCl pH 8)

In Abbildung 5.2 sind die Schmelzkurven von eIF4AI, eIF4GICD und dem Komplex (eIF4AI:eIF4GICD) in dem Puffer 50 mM Tris, pH 8 dargestellt. Hierbei wird die relative Fluoreszenz gegen die Temperatur aufgetragen. Bei der Schmelzkurve von eIF4GICD ist ein Plateau erkennbar. Die Schmelzkurve von eIF4A hat einen normalen Verlauf, ebenso die Schmelzkurve von Komplex eIF4AI:eIF4GICD.

Tabelle 5.1 : Schmelztemperatur in Puffer mit 0 mM Natriumchlorid

Puffer	10 mM Phosphat pH 7.0	50 mM Hepes pH 7.5	50 mM Tris pH 8	50 mM Tris pH 8.5
eIF4A	$45 \pm 1^\circ\text{C}$	$41 \pm 2^\circ\text{C}$	$42 \pm 1^\circ\text{C}$	$41.5 \pm 1^\circ\text{C}$
eIF4GICD	$49 \pm 2^\circ\text{C}$	$48 \pm 1^\circ\text{C}$	$48.5 \pm 2^\circ\text{C}$	$49.5 \pm 1^\circ\text{C}$
eIF4A:eIF4GICD	$50.5 \pm 1^\circ\text{C}$	$50.5 \pm 2^\circ\text{C}$	$51.5 \pm 1^\circ\text{C}$	$51.0 \pm 2^\circ\text{C}$

Bei Vergleich der Daten aus der Tab. 5.1 in Tris-Puffer fällt auf, dass eIF4A eine Schmelztemperatur von $42 \pm 1^\circ\text{C}$ aufweist, eIF4GICD jedoch eine Schmelztemperatur von $48.5 \pm 2^\circ\text{C}$. Der Komplex eIF4A:eIF4GICD hat eine Schmelztemperatur von $51.5 \pm 1^\circ\text{C}$. Beim Vergleich der anderen Puffersubstanzen zeigen sich ähnliche Ergebnisse.

Bei einer Gel-Permeations-Chromatographie darf nicht auf die Verwendung von Natriumchlorid verzichtet werden, da das Natriumchlorid die Interaktion von Protein und Superdex®

unterbindet. Deswegen wurden erhaltene Komplexe nach der Gel-Permeations-Chromatographie in einen Puffer ohne Natriumchlorid umgepuffert.

Der Puffer, der für die Gel-Permeations-Chromatographie genutzt wurde, ist 50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8. Beim Vergleich der Daten (Tab. 5.1) fällt auf, dass eIF4A eine Schmelztemperatur von $45.5 \pm 2^\circ\text{C}$ aufweist, eIF4GICD hat eine Schmelztemperatur von $49.5 \pm 2^\circ\text{C}$ und der Komplex eIF4A:4GICD eine Schmelztemperatur von $50.5 \pm 1^\circ\text{C}$. Im Vergleich der anderen Puffersubstanzen zeigen sich die gleichen Ergebnisse.

Tabelle 5.2: Schmelztemperatur verschiedener Puffer mit 100 mM Natriumchlorid

Puffer	10 mM Phosphat pH 7.0	50 mM Hepes pH 7.5	50 mM Tris pH 8	50 mM Tris pH 8.5
eIF4A	$46 \pm 1^\circ\text{C}$	$44 \pm 1^\circ\text{C}$	$45.5 \pm 2^\circ\text{C}$	$45.5 \pm 2^\circ\text{C}$
eIF4GCTD	$46 \pm 2^\circ\text{C}$	$47 \pm 2^\circ\text{C}$	$49.5 \pm 1^\circ\text{C}$	$49.5 \pm 1^\circ\text{C}$
eIF4A:eIF4GCTD	$50 \pm 1^\circ\text{C}$	$50 \pm 1^\circ\text{C}$	$50.5 \pm 1^\circ\text{C}$	$50.5 \pm 1^\circ\text{C}$

Der Puffer, der für die Gel-Permeations-Chromatographie genutzt wurde, ist 50 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8. Bei Vergleich der Daten in der Tabelle 5.2 fällt auf, dass eIF4A eine Schmelztemperatur von $45.5 \pm 2^\circ\text{C}$ aufweist. eIF4GICD hat eine Schmelztemperatur von $49.5 \pm 2^\circ\text{C}$. Der Komplex eIF4A:4GICD hat eine Schmelztemperatur von $50.5 \pm 1^\circ\text{C}$.

Alle Schmelzkurven sind im Abschnitt 8.1 (Abbildung 8.1-8.3) dargestellt. Aufgrund dieser Daten wurde beschlossen, für die Aufreinigung eIF4A mit eIF4GICD zu stabilisieren (5.3).

Ebenfalls wurden die Experimente mit RNA und Adenosine 5'-(β,γ -imido)triphosphate(ANP-PNP) mit allen Puffer-Systemen dargestellt (Abschnitt 8.1, Abb.8.4). Hierbei ist zu erkennen, dass AMP-PNP keinen Einfluss auf die Stabilität hat. Hier beträgt die Schmelztemperatur $50 \pm 3^\circ\text{C}$.

Diese Methode wird meistens zur Analyse von Puffern verwendet, die einen Einfluss auf die Kristallisation haben können. Je besser der Puffer für die Proteine ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, die Proteine zu kristallisieren.

5.2 Co-Aufreinigung von eIF4IA:eIF4GICD

Bei der Co-Aufreinigung wurden die His-eIF4AI und His-eIF4GICD im Rohlysat vereint und anschließend über Ni-NTA-Affinitätschromatographie angereichert (siehe Kapitel 4.2.4). Der Überschuss von eIFGICD(1572) wurde mittels Gel-Permeations-Chromatographie vom Komplex getrennt. Aus dem Chromatogramm (Abb. 5.3) ist ersichtlich, dass das Elutionsvolumen des Komplexes 73 mL beträgt. eIF4A hat dabei ein Elutionsvolumen von ca. 83 mL. Durch eine SDS-Gel-Analyse wurde ein 1:1-Komplex erkennbar.

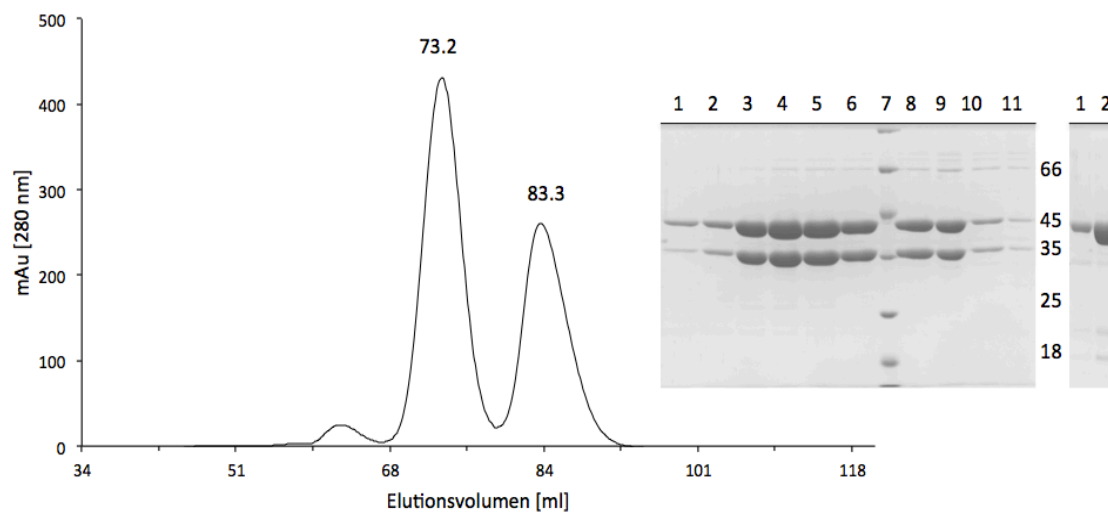


Abbildung 5.3: Elutionsprofil: Komplexbildung eIF4AI:eIF4GICD(1572). Das Elutionsvolumen von 73.2 ml entspricht dem Komplex und das Elutionsvolumen von 83 ml charakterisiert eIF4A. SDS Page: Spur 1-6 Fraktionen von Elutionsvolumen von 73.2; Spur 7: Unstained Protein Marker (kDa); Spur: 8-11 Fraktionen von Elutionsvolumen von 83.2; Spur 1-2: Protein von Elutionsvolumen von 83 ml eIF4AI: M_w von 42kDa, eIF4GICD: M_w von 35kDa

Für die Co-Aufreinigung wurde die dynamische Lichtstreuung gemessen. Dabei wurde keine Veränderung im Vergleich (Abschnitt 5.1) der Radien gefunden; die Fraktionen wiesen eine Monodispersität von 5 % auf.

5.3 Oberflächenentropie-Reduktion

Die Durchführung von Oberflächenentropie-Reduktionsmutanten (*Surface Entropy Reduction*, SER) kann zu einer Verbesserung der Kristallisation beitragen.

5.3.1 Oberflächenentropie-Reduktionsmutanten von eIF4GICD

Das Konstrukt von eIF4GICD besteht aus einer N-terminalen und C-terminalen Domäne; diese beiden Domänen sind über einen *Linker* verbunden. Durch die Benutzung des in

Kapitel 4.2.11 beschriebenen Webservers konnten für eIF4GICD drei Clustermutanten identifiziert werden (Abb. 5.4).

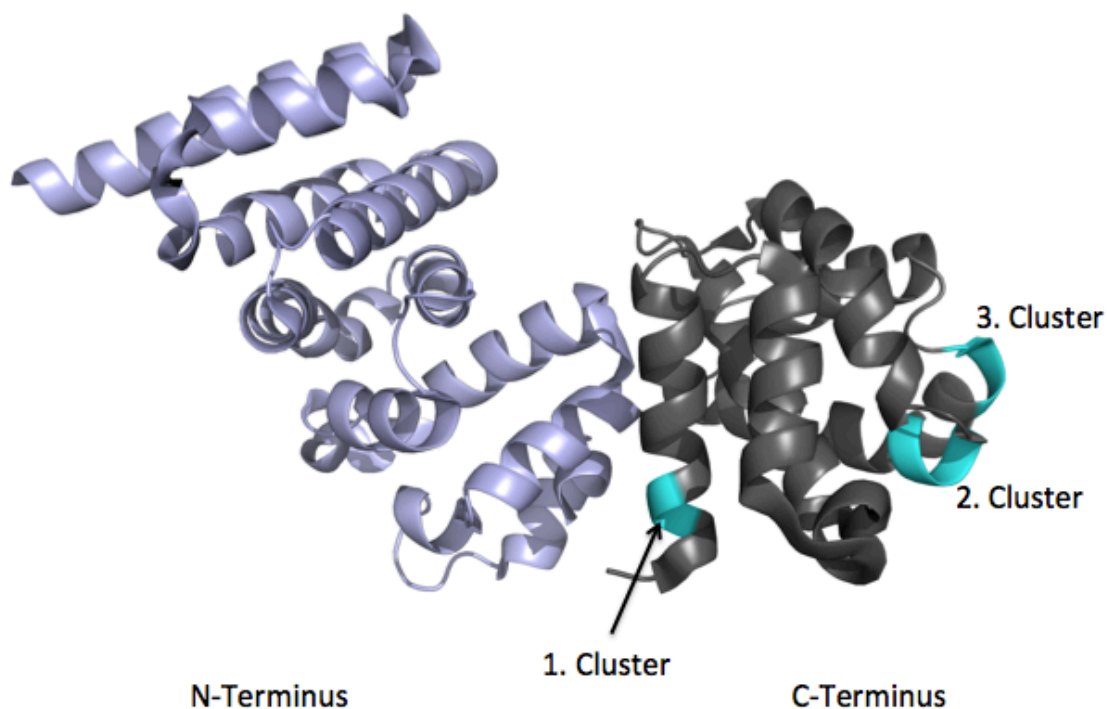


Abbildung 5.4: Schematische Darstellung der Oberflächenentropie-Reduktionsmutanten in der Struktur (PDB 1UG3) von eIF4GICD (1234-1572). Der N-Terminus ist in der Farbe hellblau dargestellt. Der Linker ist nicht strukturiert. Der C-Terminus ist schwarz dargestellt, die Cluster türkis.

Das erste gefundene Cluster ist E1428/E1429/E1431. Es befindet sich vor dem *Linker* von eIF4GICD und wurde zu E1428A/E1429A/E1431A mutiert.

Das zweite Cluster ist E1518/Q1519/K1520/E1521 und wurde zu E1518A/Q1519Q/K1520T/E1521A mutiert; diese Reste befinden sich in der C-terminalen Domäne von eIF4GICD. Diese beiden Dreifachmutanten wurden löslich aus *E. coli* exprimiert und über eine Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt. Zur Überprüfung, dass die Mutation keinen Einfluss auf die Komplexbildung genommen hatte, wurde eine Gel-Permeations-Chromatographie durchgeführt. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass die beiden Mutanten E1428A/E1429A/E1431A und E1518A/Q1519Q/K1520T/E1521A keinen Einfluss auf die Komplexbildung haben (Abschnitt 8.2; Abb. 8.6). Diese Mutanten wurden für die Kristallisation angesetzt; auch nach zwei Jahren sind jedoch keine Kristalle gewachsen.

Aus der Verminderung der Oberflächenentropie konnte keine Veränderung des Kristallisationsverhaltens erkannt werden; auch hier bildeten sich keine Kristalle.

5.3.2 Oberflächenentropie-Reduktionsmutanten von eIF4AI

Bei der Benutzung des SER Servers (Methode 4.2.11) konnten für die Aminosäuresequenz von eIF4AI drei Clustermutanten identifiziert werden. Das erste Cluster K261/K262/E263/E264 findet sich im *Linker*, der die beiden RecA-Domänen verbindet; diese wurde zu K261A/K262I/E263D/E264A mutiert (Abb. 5.5).

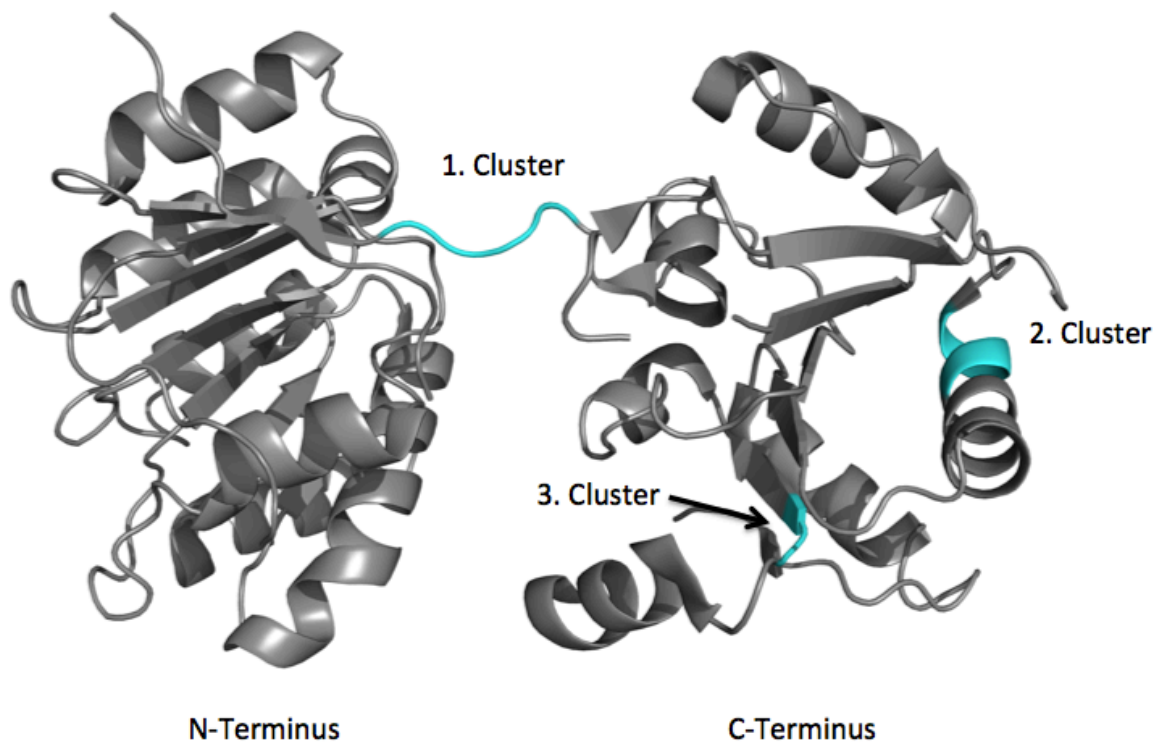


Abbildung 5.5: Schematische Darstellung der Oberflächenentropie-Reduktionsmutanten in der Struktur (PDB 2ZU6) von eIF4A (20-406). Das gesamte Protein ist dargestellt in Grau, die Clustermutanten sind türkis hervorgehoben.

Zwei weitere Cluster liegen in der C-terminalen RecA-Domäne von eIF4AI: Das zweite Cluster E280/E281/K283 wurde zu E280N/E281S/K283R mutiert. Das letzte Cluster Q332/K333/E334 wurde zu Q332H/K333S/E334A mutiert. Beim Austausch dieser Aminosäuren wurde Bezug genommen auf die Homologie der DEAD Box-Helikase von *Methanocaldococcus jannaschii* bezogen, ein Archaeobakterium. Es werden in der Kristallisation meistens Homologe von Archaeen verwendet, da diese einfacher zu kristallisieren sind. Es wurden Testexpressionen mit Sonifikation (Vibra Cell, *Sonics*), und BugBuster™ (*Merck KGaA*) als Aufschlussmittel durchgeführt; keine Mutante wurde löslich in *E. coli* synthetisiert.

5.4 Verkürzung von eIF4GICD

Wie in Abschnitt 5.3.1 beschrieben, zeigen die Mutationen C-terminal von Rest 1428 keinen Einfluss auf die Komplexbildung. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die C-terminale Domäne von eIF4GI um 146 Aminosäuren verkürzt.

Mittels PCR wurde die DNA, welche für eIF4GICD(1426) kodiert, amplifiziert und in pET28a ligiert. Das Konstrukt wurde in einem Autoinduktions-Medium in BL21 (DE3) exprimiert und mittels Co-Anreicherung durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt (siehe auch 5.2). Zur Komplexbildung wurde eine Gel-Permeations-Chromatographie durchgeführt. Für den Komplex wurde ein Elutionsvolumen von 80 mL gemessen; das Elutionsvolumen von eIF4GICD(1426) betrug 91 ml (Abb. 5.6). In der SDS-Gel-Analyse ergab sich ein 1:1-Komplex. Daraus lässt sich ableiten, dass eine Verkürzung von eIF4GICD keinen Einfluss auf die Komplexbildung mit eIF4A hat.

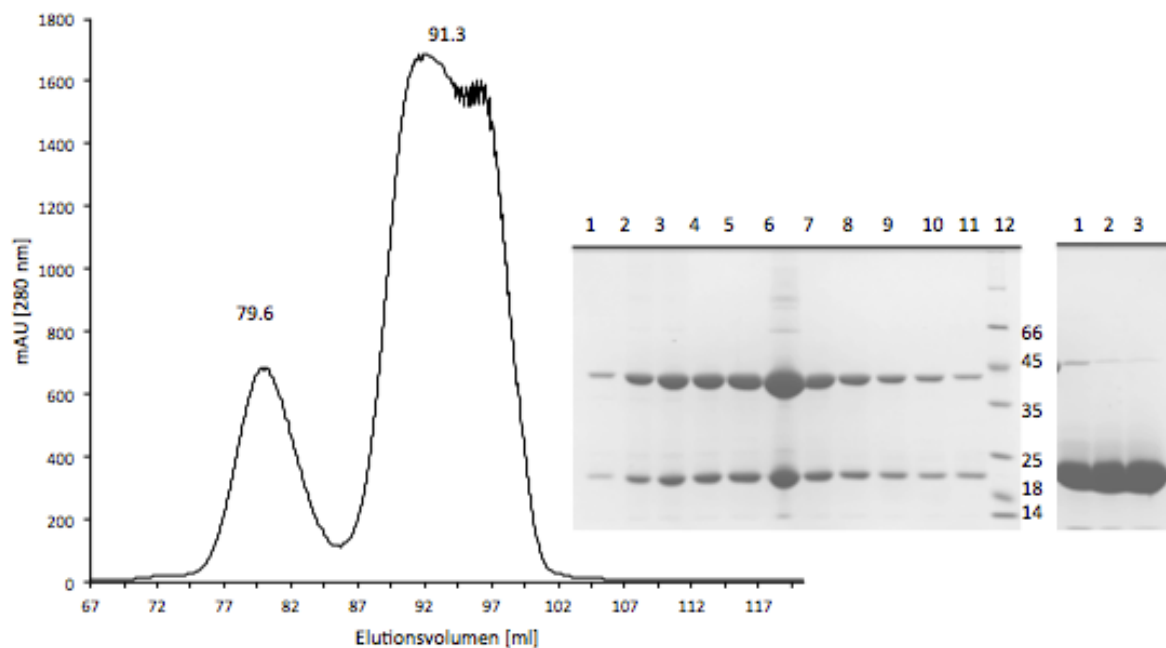


Abbildung 5.6: Elutionsprofil von der Komplexbildung eIF4A:eIF4GICD(1426). Das Elutionsvolumen von 80 entspricht dem Komplex und das Elutionsvolumen von 91.97ml entspricht eIF4GICD(1426). SDS Page: Spur 1-11 Fraktionen von der Elutionsvolumen von 73.2 ml, Spur 12: Unstained Protein Marker (kDa), Spur 1-3: drei Fraktionen von das Elutionsvolumen von 91.97ml entspricht eIF4GICD(1426). (eIF4A: M_w von 42kDa, eIF4GICD: M_w von 23.4kDa).

Mittels nativer Gelelektrophorese wurde das Laufverhalten von eIF4A, eIF4GICD(1426) und dem Komplex in nativem Zustand untersucht. Hierbei ist zu beachten, dass die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI), oder genauer: nach ihrer nativen Ladung, aufgetrennt

werden (*ExPasy ProtParam tool*). Die native Gelelektrophorese (Abb. 5.7B) wurde bei einem pH-Wert von 8,3 durchgeführt.

eIF4A hat einen theoretischen pI von 5,5, für eIF4GICD(1426) beträgt dieser Wert 5,0. Der Komplex hat einen theoretischen pI von 5,6. Alle Proteine waren im Puffer der nativen Gelelektrophorese negativ geladen. In Abb. 5.7B ist zu erkennen, dass eIF4A in oberen Bereich des nativen Gels läuft. Der Komplex läuft in der Mitte des, und eIF4GICD(1426) migriert noch schneller und ist im unteren Bereich. Der Komplex und eIF4A haben einen identischen pI, unterscheiden sich aber in ihrer Größe; eIF4A hat eine Größe von 43 kDa und der Komplex von 68 kDa, wodurch ein anderes Laufverhalten erwartbar ist. eIF4A befindet sich wahrscheinlich aufgrund der Abwesenheit von ATP und RNA in der offenen Konformation, das könnte der Grund für das langsame Laufverhalten sein.

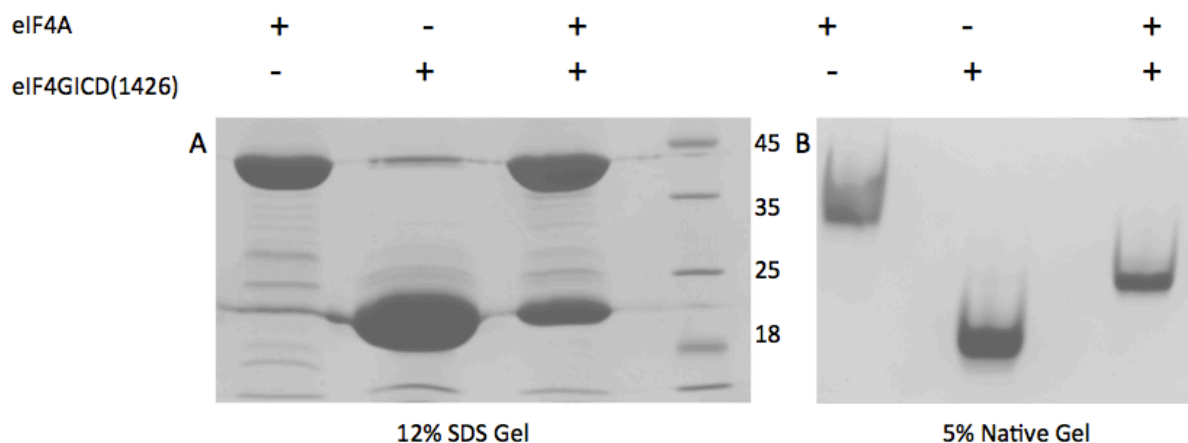


Abbildung 5.7: Vergleich des Laufverhaltens von eIF4A, eIF4GICD(1426) und Komplex in der (A) nativen Gelelektrophorese (0,5xTBE Puffer pH 8.3) und (B) SDS-Gelelektrophorese. Mw: eIF4A 43 kDa, eIF4GICD(1426) 23.5 kDa, Komplex eIF4A:eIF4GICD(1426) 70 kDa. Marker: Unstained Protein Markern (kDa)

Im Gegensatz dazu läuft eIF4GICD(1426) entsprechend seiner Ladung und Größe. Zum Vergleich des nativen Gels wurde die gleichen Proben auf einen 12 % SDS-Gel (Abb.5.7A) aufgetragen. Hiermit kann auch bewiesen werden, dass sich ein Komplex bildet. Bei der Probe von eIF4GICD(1426) ist auf dem SDS-Gel eine Bande zu erkennen.

5.5 Kristallisation

Alle zuvor gezeigten Experimente wurden zur Verbesserung der Kristallisation des Komplexes aus eIF4A:eIF4GICD durchgeführt.

5.5.1 Kristallisation von eIF4A1:eIF4GICD(1572)

Der in Abschnitt 5.2 beschriebene Komplex eIF4A1:eIF4GICD(1572) wurde für Kristallisationsexperimente angesetzt; bis jetzt konnten jedoch keine Kristalle gefunden werden.

Durch die Veränderung der Reinigungsprotokolle wurden in den Bedingungen 2 % (v/v) Tacsimate, 0.1 M HEPES pH 7.0, 20 % PEG 3350 und 8 % Tacsimate (v/v) pH 6.0, 20 % (v/w) PEG 3350 kleine rundliche Kristalle erhalten. Die Kristalle zeigen keine Beugungsmuster (Abb.5.6A, B). Zur Optimierung dieser Kristalle wurden ein Feinscreen durchgeführt mit einer Variation des pH-Werts und der PEG-Konzentration. Im Feinscreen wurden dieselben Kristalle beobachtet; die Kristalle konnten nicht vergrößert werden.

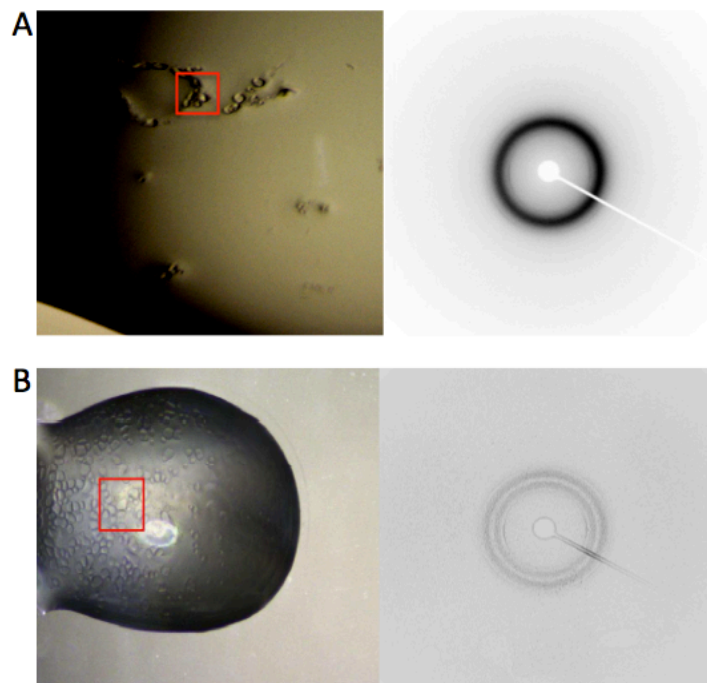


Abbildung 5.8: Kristallbilder des Komplexes eIF4A1:eIF4GICD(1572) und Beugungsmuster. A: 2 % Tacsimat (v/v), 0.1 M HEPES pH 7.0, 20 % (w/v) PEG 3350 B: 8 % Tacsimat (v/v) pH 6.0, 20 % (v/w) PEG 3350

Nach drei Tagen wurden Quasikristalle in der Bedingung 0.2 M Ammoniumacetat 0.1 M BIS-TRIS, pH 5.5, 25 % (v/w) PEG 3350 erhalten. Diese Kristalle konnten reproduziert werden (Abb. 5.9A). Zur Optimierung der Quasikristalle wurde ein Feinscreen durchgeführt, der eine Variation des pH-Werts und der Konzentration von PEG beinhaltete. Es wurden dieselben Quasikristalle beobachtet, welche ebenfalls an der Swiss Light Source vermessen wurden mit dem Resultat, dass aus den Kristallen kein Beugungsmuster erhalten wurde.

Um eine bessere Kristallform zu erhalten wurde die Bedingung 0.2 M Ammoniumacetat 0.1 M BIS-TRIS, pH 5.5, 25 % (v/w) PEG 3350 mit verschiedenen Zusätzen (Additive Screen, Hampton Research) gescreened.

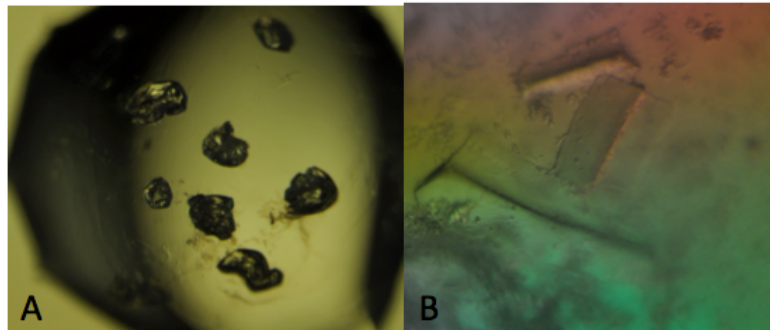


Abbildung 5.9: Kristallbilder des Komplexes eIF4A:eIF4GICD(1572), A: 0.2 M Ammoniumacetat 0.1 M BIS-TRIS, pH 5.5, 25 % (w/v) PEG 3350, B: 0.2M Ammoniumacetat 0.1 M BIS-TRIS, pH 5.5, 25 % (v/w) PEG 3350 mit 0.04 % (v/v) Dichloromethan.

Bei dieser Optimierung wurden Experimente bei Temperaturen von 4°C, 16°C und 20°C durchgeführt. Beim Zusatz von 0.04 % (v/v) Dichloromethan und einer Temperatur von 16°C wurden schließlich Kristalle (Abb. 5.9B) gefunden, die an der SLS gemessen wurden, aber keine Beugungsmuster lieferten.

5.5.2 Kristallisation mittels *CrystalHarp*[™] von eIF4A:eIF4GICD(1572)

Die *CrystalHarp*[™] gehört zu der Kristallisationsmethode *Counter Diffusion* (Abschnitt 4.2.8.2). Die *CrystalHarp*[™] wurde bei 4 °C und 20 °C angesetzt mit einer Komplexkonzentration von 8-10 mg/mL. Bei einer Temperatur von 4°C wurden nach zwei Tagen unter den folgenden Bedingungen kleine Kristalle gefunden: A: 0.1 M Ammoniumsulfat 0.1 M Citrate (pH 5.5), 12 % (v/w) PEG 4000, B: 0.1 M Calciumchlorid, 0.1 M MES (pH 6.5), 15 % (v/w) PEG 4000 und C: 0.1 M Natriumcacodylat (pH 6.0) 10 % (v/w) MPEG 5000 10 % (v/v) 2-Propanol (Abb. 5.10).

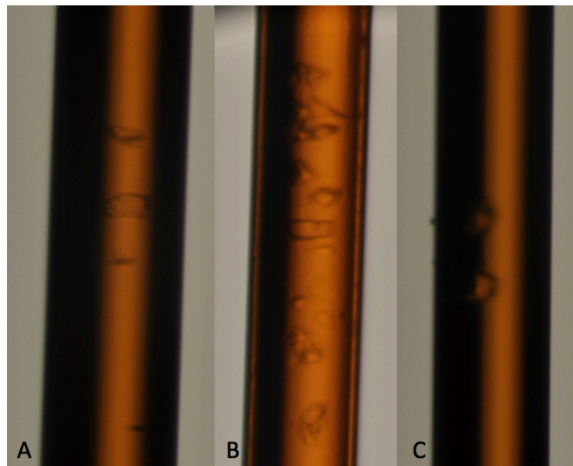


Abbildung 5.10: Kristallbilder in der CrystalHarp™ bei 4°C. A: 0.1 M Ammoniumsulfat 0.1 M Citrate (pH 5.5), 12 % (v/w) PEG 4000; B: 0.1 M Calciumchlorid, 0.1 M MES (pH 6.5) ,15 % (v/w) PEG 4000; C: 0.1M Natriumcacodylat (pH 6.0), 10 % (v/w) MPEG 5000 10 % (v/v) 2-Propanol.

Diese Kristalle wurden aus der CrystalHarp™ geschnitten, um diese in einer Kapillare an der In-House Röntgenanlage bei 4°C zu vermessen. Hier konnte jedoch kein Beugungsmuster erhalten werden.

Bei einer Temperatur von 20°C wurden bei den folgenden Bedingungen größere Kristalle gefunden: A: 0.1 M Natriumchlorid, 0.1 M Natriumcacodylat (pH 6.0), 12 % (v/w) PEG 8000; B: 0.1 M Magnesiumacetat, 0.1 M MES (pH 6.5), 12 % (v/w) PEG 8000; C: 0.15 M Natriumchlorid, 0.1 M Tris (pH 8.5) ,15 % (v/w) PEG 2000 (Abb. 5.11).

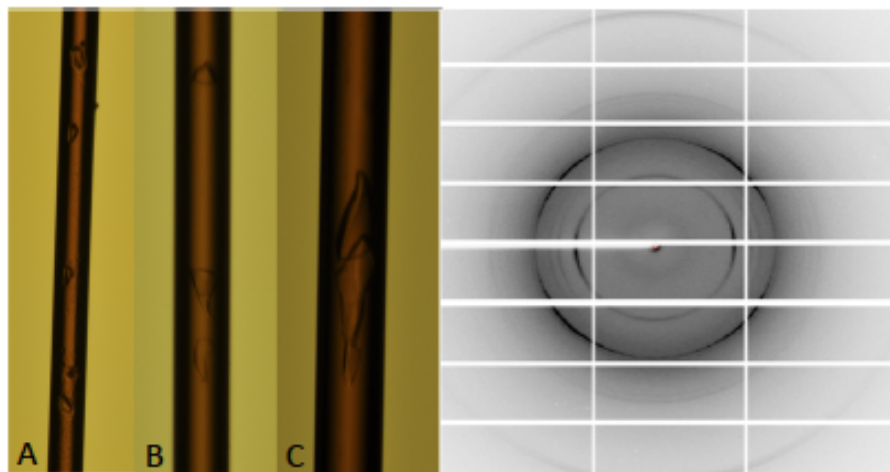


Abbildung 5.11: Kristallbilder in der CrystalHarp™ bei 20°C. A:0.1M Natriumchlorid, 0.1M Natriumcacodylat (pH 6.0), 12 % (v/w) PEG 8000 und Beugungsmuster; B: 0.1 M Magnesiumacetat, 0.1 M MES (pH 6.5), 12 % (v/w) PEG 8000; C: 0.15 M Natriumchlorid, 0.1 M Tris-HCl (pH 8.5), 15 % (v/w) PEG 2000.

Die CrystalHarp™ wurden zur SLS gegeben und dort mit Hilfe des Roboters bei 20°C vermessen; es konnte jedoch wieder kein Beugungsmuster der Kristalle erhalten werden.

5.5.3 Kristallisation von eIF4A1:eIF4GICD(1426)

Der Komplex wurde wie in Kapitel 5.4 beschrieben angereicht und auf eine Konzentration von 6 mg/ml eingengt. Für die Kristallisation wurde die Methode der *Vapor Diffusion* verwendet. Die Kristallisation wurde bei 4°C und 20°C durchgeführt.

Nach einem Tag wurden in den Kristallisationsexperimenten bei 20°C in den Bedingungen 0.2 M Natriumcitrat, 20 % (w/v), PEG 3350 und 1 M Natriumcitrat, 100 mM Tris (pH 7.0), 200 mM Natriumchlorid Nadelcluster gefunden (Abb. 5.12). Zur Optimierung der Bedingung 0.2 M Natriumcitrat, 20 % (w/v) PEG 3350 wurden Feinscreens durchgeführt, in denen die PEG-Konzentration variiert wurde. Für die Bedingung 1 M Natriumcitrat, 100 mM Tris (pH 7.0) 200 mM Natriumchlorid (Abb. 5.12B) wurde die Konzentration von Natriumcitrat von 1.2 M bis 0.8 M und der pH-Wert von 8,0 bis 7,0 verändert. Hierbei konnten unter beiden Bedingungen die Kristalle reproduziert werden. Es konnten jedoch keine größeren Kristalle erhalten werden; hierbei wurden die Komplexkonzentration von 5-10 mg/ml variiert.

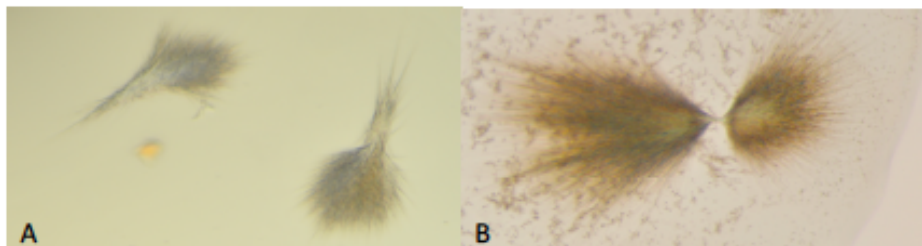


Abbildung 5.12: Kristallbilder von Komplex eIF4A:eIF4GICD(1426). A: 0.2 M Natriumcitrat, 20 % (w/v) PEG 3350, B: 1 M Natriumcitrat 100 mM Tris (pH 7), 200 mM Natriumchlorid.

Es wurde auch versucht, mittels *low melting agarose* das Kristallwachstum zu verlangsamen, was aber ebenfalls nicht zu einer Kristallbildung führte.

Da es sich bei dem vorliegenden Befund um sehr kleine Nadeln handelt, wurde die Methode des *Seedings* (Animpfen) verwendet. Hierbei wurde die Seedstocklösung auch im Screen verwendet und ebenfalls im Feinscreen. Dieses Vorgehen lieferte jedoch wieder nur dieselben Kristalle. Die Kristalle wurden mit 30 % Glycerin vor Eiskristallschaden geschützt und zur *Swiss Light Source* an das Paul-Scherrer-Institut (Villingen, Schweiz) sowie an das *European Synchrotron Radiation Facility* (Grenoble, Frankreich) gegeben. Im Ergebnis ergab sich kein Beugungsmuster für diese Kristalle. In den Kristallisationssätzen bei 4°C sind keine Kristalle gewachsen.

5.6 Aktivitätstests

Bei der RNA-abhängigen ATP-Helikase und den Komplexen, in denen sie enthalten ist, wurde die ATPase-Aktivität mit dem EnzChek® Phosphat Assay Kit bestimmt (Abschnitt 4.2.10).

Die Aktivität von eIF4A wurde bei der Auswertung auf 100 % gesetzt und zu den anderen Komplexen in Relation gesetzt. Beim Komplex eIF4A:eIF4GICD wurde das molekulare Verhältnis 1:1 eingesetzt. eIF4GICD(1572) zeigte einen inhibierenden Effekt auf eIF4A: es ist eine Verringerung der Aktivität von 70 % ersichtlich (Abb. 5.13). Der inhibierende Effekt wurde auch bei der Verkürzung von eIF4GICD(1426) im Komplex beobachtet. Aus diesem Resultat kann geschlossen werden, dass die Verkürzung keine Veränderung auf den inhibierenden Effekt von eIF4GICD(1572) auf eIF4A hat.

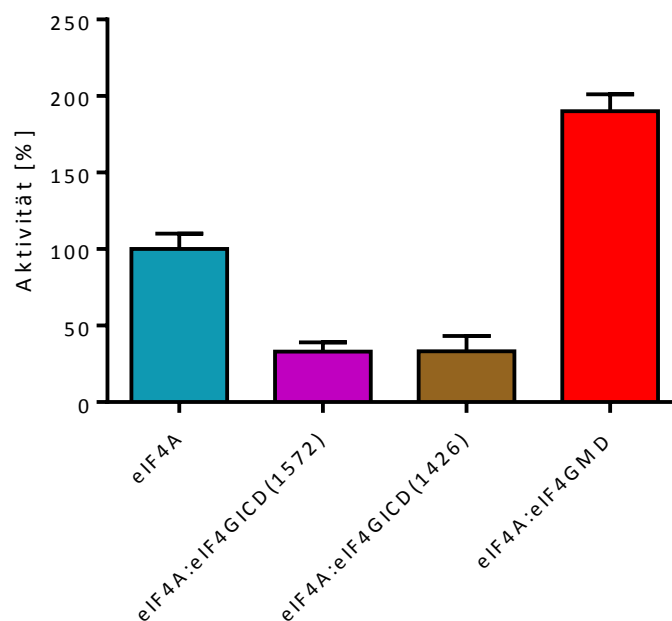


Abbildung 5.13: Aktivität von eIF4A, eIF4A:eIF4GI Komplex. eIF4A:eIF4GMD; 2 mM ATP 10 mM MgCl₂ Lösung und 0.3 µg/µl Hefe RNA wurde für alle Ansätze verwendet. Für das Experiment wurden Triplikate durchgeführt, wodurch sich die Fehlerbalken ergaben.

Für den Komplex eIF4A:eIF4GMD wurde ein molekulares Verhältnis von 1:2,5 eingesetzt. Hier wurde eine Aktivierung der ATPase-Aktivität von 90 % erzielt, wodurch der aktivierende Effekt von eIF4GMD auf eIF4A auch für *Homo sapiens* bestätigt wird.

eIF4GICD wurde in den Konzentrationen von 0.3-8 µM variiert, um den Prozess der Inhibierung zu untersuchen. Die finale Konzentration von eIF4A beträgt in allen Proben

4 μM . Aus der Abbildung 5.14 lässt sich deutlich bei 4 μM von eIF4GICD eine Verringerung der Aktivität von eIF4A um 70 % erkennen.

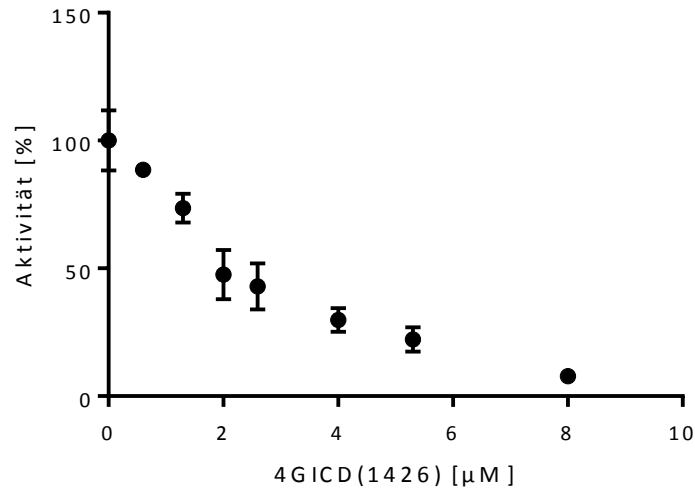


Abbildung 5.14: Diagramm der Inhibierung von eIF4GICD auf eIF4A. 2 mM ATP 10 mM MgCl_2 Lösung und 0.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Hefe RNA wurde für alle Ansätze verwendet. Für das Experiment wurden Triplikate durchgeführt, wodurch sich die Fehlerbalken ergaben.

Es ist ferner durch die erhöhte Menge an eIF4GICD eine weitere Inhibierung von eIF4A bei Konzentrationen von 5.3 μM und 8 μM zu erkennen.

5.7 Untersuchung der Interaktion des eIF4A:eIF4GI(1426)

Bei der Bio-Layer-Interferometrie wurde ein mit Ni-NTA überzogener Chip verwendet. An diesem Chip wurde die His-eIF4GICD-Domäne gebunden, wodurch es zum Ligand wurde. Als Analyt wurde eIF4AI in den Konzentrationen von 75-1250 nM eingesetzt. Bei einer Interaktion war eine Assoziation und bei Zugabe von Puffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7.5 1 mM DTT 0.1 % BSA und 0.01 % Tween) eine Dissoziation von eIF4AI und eIF4GICD(1426) zu erkennen (Abb. 5.15).

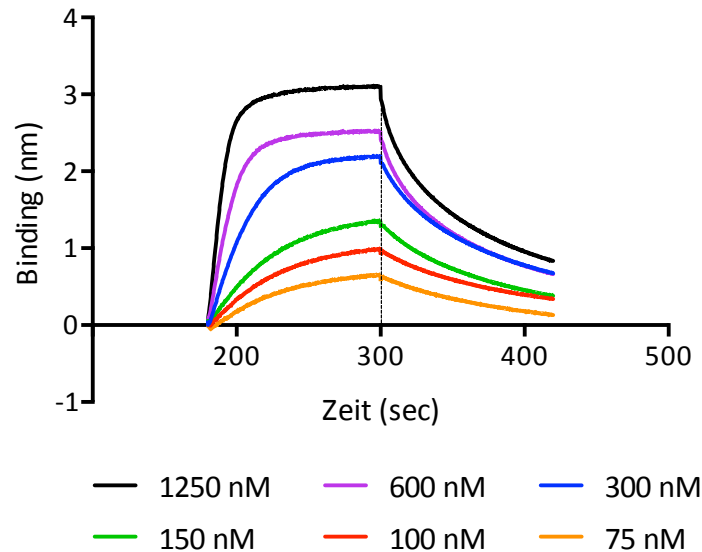


Abbildung 5.15: Bindungsdiagramm eIF4A:I:eIF4GICD(1426). (Bindungsdiagramm: schwarz: 1250 nM eIF4A, lila: 600 nM eIF4A, blau: 300 nM eIF4A, grün: 150 nM eIF4A, rot: 100 nM eIF4A, gelb: 75 nM eIF4A)

Hierfür wird zum Auswerten ein 1:1 Komplex in der Fitting-Prozedur angenommen, , die durch die Gleichungen im Abschnitt 4.2.12 des Methodenteils beschrieben wird.

In der Tabelle 5.3 ist der K_D -Wert aus den Daten dargestellt. Aus den Werten ist erkennbar, dass die Dissoziation (k_d) des Komplexes schnell verläuft. Die Assoziation (k_a) des Komplexes verläuft eher langsamer.

Tabelle 5.3: K_D -Wert aus dem 1:1-Fit

K_D (nM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)
195,8	$6.74 \text{ E}4 \pm 2.0 \text{ E}3$	0.013 ± 0.0023

Aus dem 1:1-Fit wurde eine Dissoziationskonstante (K_D) von 195 nM ermittelt.

5.8 Komplexbildung von eIF4A *Saccharomyces cerevisiae* mit eIF4GICD

Da der Komplex eIF4A:eIF4GICD schlechte Eigenschaften für die Kristallisation (Abschnitt 5.5) zeigte, wurden Überlegungen angestellt, den Organismus zu wechseln. So kam die Überlegung zustande, die Komplexbildung mit eIF4A aus *Saccharomyces cerevisiae* (ScIF4A) durchzuführen, da dieses Protein erfolgreich kristallisiert werden konnte (Abschnitt 1.1.1 /1.1.2) [26, 27, 37].

Es wurde ScIF4A in *E. coli* pET28a exprimiert und anschließend mittels Ni-NTA Affinitätschromatographie aufgereinigt. eIF4GICD wurde wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben isoliert. Anschließend wurde ScIF4A mit eIF4GICD über eine Gel-Permeations-

Chromatographie zur Komplexbildung gegeben. Aus dem Elutionsprofil ist erkennbar, dass ScelF4A ein Elutionsvolumen von 80,6 ml und eIF4GICD ein Elutionsvolumen von 89 ml aufweist (Abb. 5.16, links).

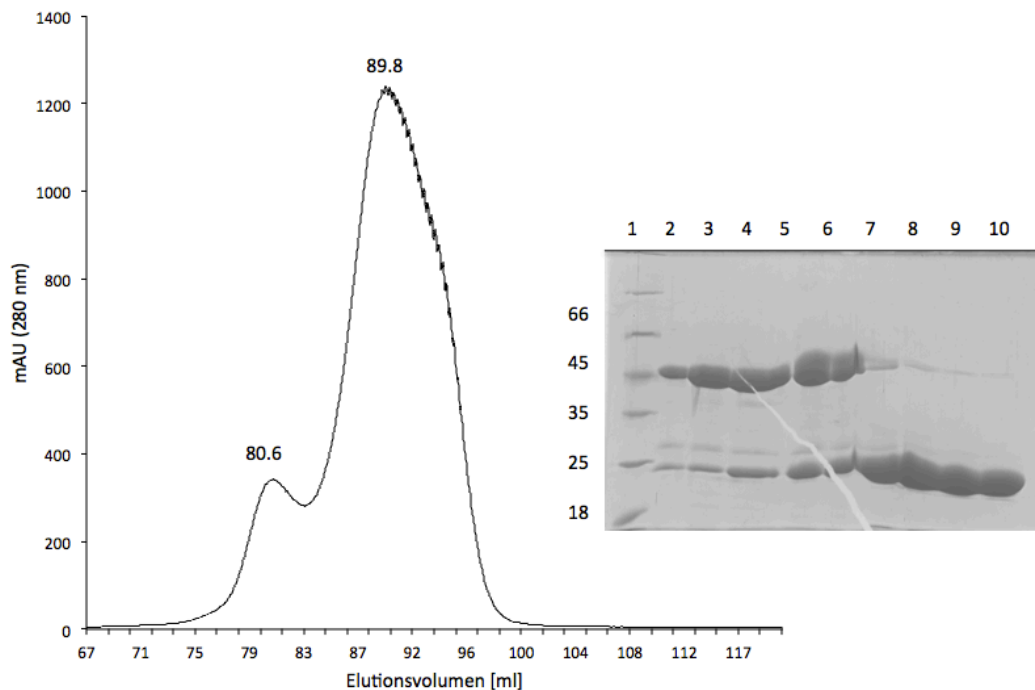


Abbildung 5.16: Elutionsprofil von der Komplex-Bildung ScelF4AI:eIF4GICD(1426) Das Elutionsvolumen von 80.6 ml entspricht ScelF4AI und das Elutionsvolumen von 89.8 ml entspricht eIF4GICD(1426). SDS Page: Spur 1: Unstained Protein Marker (kDa), Spur 2-5 sind die Fraktionen des Elutionsvolumens von 80.63 ml, Spur 6-9 sind die Fraktionen von Elutionsvolumen von 89 ml ScelF4AI: MW von 45 kDa, eIF4GICD: MW von 35 kDa.

Anhand der SDS-Gel-Analyse (Abb. 5.15, rechts) ist zu erkennen, dass das Elutionsvolumen für scelF4A bei 80 ml steht und für eIF4GICD bei 89 ml. Aus den Ergebnissen der Elutionsprofile und der SDS-Gel-Analyse kann geschlossen werden, dass die beiden Proteine eIF4GICD und ScelF4A ineinander laufen und keinen stabilen Komplex bilden.

5.9 Geschlossene Konformation von eIF4A

In der Kristall-Struktur von eIF4A-PDCD4 [43] (siehe Abschnitt 5.3.2, Abb. 5.5) ist zu erkennen, dass in der C-terminalen Domäne von eIF4A die Elektronendichte vieler Aminosäuren fehlt, weswegen ein hoher Grad ungeordnet in den Kristallen vorliegt (siehe Abschnitt 5.3.2). Auf einen Stabilisierungseffekt von PDCD4 für eIF4A kann auch geschlossen werden, da PDCD4 zwischen den beiden RecA-ähnlichen Domänen bindet. Aufgrund der nicht streuenden Kristalle (Abschnitt 5.5) des eIF4A:eIF4GICD-Komplexes wurde für die vorliegende Arbeit überlegt, eIF4A zu stabilisieren und es für die Komplexbildung mit

eIF4GICD zu nutzen. Die beiden RecA-ähnlichen Domänen sollten über eine Disulfidbrücke in der geschlossenen Konformation fixiert werden, was eine Verringerung der Flexibilität für eIF4AI zur Folge hätte und eventuell auch eine verbesserte Kristallisierbarkeit.

5.9.1 Design der Mutante eIF4AI (G70C/(R367C))

Als Vorlage für das Design der Disulfidbrücke wurde die Kristallstruktur von eIF4AIII (PDB 2J0Q) in der geschlossenen Konformation gewählt. Zuerst wurde mit der eIF4AI-Sequenz (66 % Identität) ein Homologiemodell der geschlossenen Konformation mittels der Koordinaten 2J0Q erstellt. Dieses Homologiemodell wurde in das Programm SSBOND [83] geladen. Im Programm SSBOND wird der Abstand von einem C_β-Atom zu anderen C_β-Atomen der Aminosäuren bestimmt und mit dem C_β-Atomabstand bei Disulfidbrücken verglichen. Es werden auch die Abstände der C_α-Atome bestimmt, da Glycin kein C_β-Atom hat. Der Abstand der C_β-Atome liegt bei Disulfidbrücken zwischen 3.4-4.1 Å.

Das Programm lieferte mehrere Vorschläge für Aminosäurepaare, welche aufgrund ihres Abstands der C_β-Atome eine Disulfidbrücke eingehen könnten. Durch erneute strukturelle Analyse im Homologiemodell wurde in der vorliegenden Untersuchung ein Paar gesucht, welches die folgende Anforderung erfüllte: Das Aminosäurepaar, welches eine Disulfidbrücke eingehen kann, muss eine Aminosäure in der C-terminalen Domäne und die andere Aminosäure in der N-terminalen Domäne von eIF4A haben. Das einzige erhaltene Paar, das diese Anforderungen erfüllte, enthielt Glycin (Gly) 70, welches im Walker A-Motiv liegt. Die zweite Aminosäure dieses Paares war Arginin (Arg) 367, welches im Motiv IV gelegen ist (Abb. 5.17). Diese Aminosäuren sind funktionell wichtig und die Mutation zu Cystein wird das Protein inaktivieren, d.h. es ist nicht in der Lage, bei der Separierung der mRNA ATP zu hydrolysieren. Da es im vorliegenden Zusammenhang um Kristallisationsexperimente und Verringerung der konformationellen Flexibilität ging, wurde beschlossen, diese Variante (G70C/R367C) dennoch herzustellen.

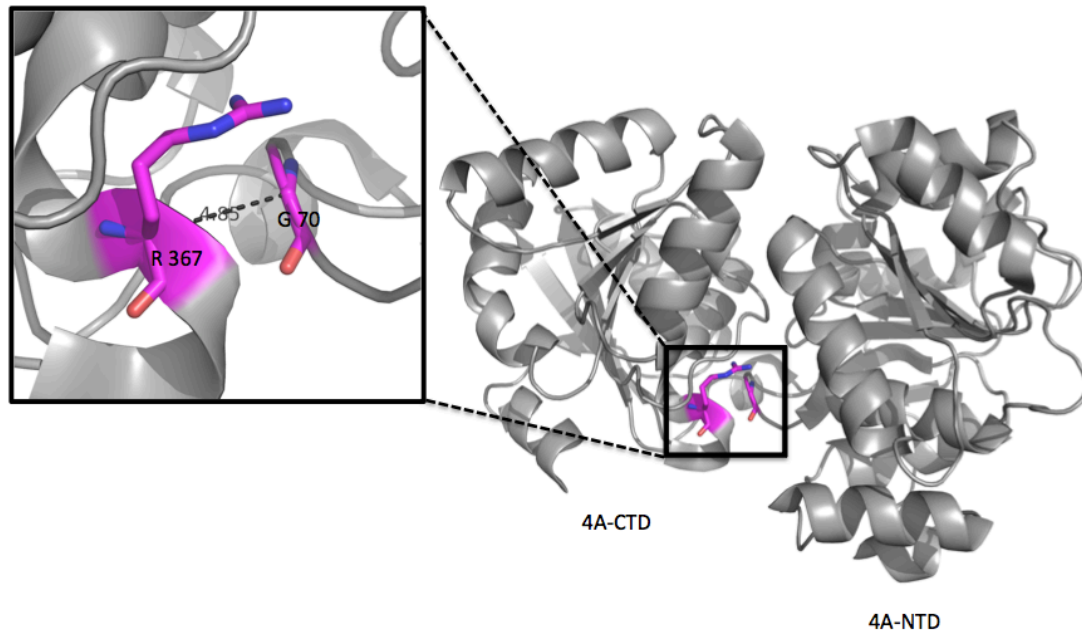


Abbildung 5.17: Strukturelle Darstellung von Cystein-Mutanten von eIF4AI. In Grau ist das Homologiemodell (eIF4AI (PDB 2J0Q)) dargestellt und in Magenta sind die beiden Aminosäure Glycin und Arginin dargestellt. Der Abstand wurde von dem C α -Atomen bestimmt und beträgt 4.85 Å.

Der Abstand der C α -Atome von G70 zu R367 beträgt laut SSBOND 4,85 Å; dieser Abstand wurde mit dem Programm Pymol (DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, USA.) bestätigt (Abb.5.17). Hierzu wurden das Glycin 70 und das Arginin 367 durch ein Cystein ausgetauscht. Die Mutante von eIF4A wurde bei Genart (*Life Technologies*) bestellt. Um die Bildung von unspezifischen Disulfidbrücken zu unterbinden, wurden alle natürlich vorkommenden Cysteine in eIF4AI zu den homologen Aminosäuren von eIF4A aus *S. cerevisiae* bzw. in einem Fall zu Serin ausgetauscht. Die folgenden Cysteine wurden wie folgt modifiziert: Cys57Ile, Cys266Thr, Cys133Val und Cys136Ser.

5.9.2 Aufreinigung von eIF4A(G70C/R367C) und Bildung der Disulfidbrücke

Die Konformationsänderung der DEAD-Box-Helikase eIF4A(G70C/R367C), die durch Bildung der Disulfidbrücke erfolgt, wurde mittels SDS-Gel-Analyse und Gel-Permeations-Chromatographie untersucht.

eIF4A(G70C/R367C) wurde mittels Affinitätschromatographie (Abschnitt 4.2.4) aufgereinigt. Direkt nach der Aufreinigung wurde auf Bildung einer Disulfidbrücke hin untersucht. Auf dem 12 % SDS-Gel ist zu erkennen, dass sich direkt nach der Reinigung keine geschlossene Konformation bildete, da die Banden bei der Probe Elution I (Spur 5, Abb. 5.18A) und die

Probe ohne Mercaptoethanol (Reduktionmittel) (Spur 7, Abb. 5.18A) keinen Laufunterschied aufwies.

Nach einem Tag Lagerung bei 4°C zeigte das 10 % SDS-Gel, dass die Probe mit Reduktionsmittel (Spur2, Abb.5.18B) eine langsamere Migration aufwies als die Proben (Spur 1, Abb. 5.18B) ohne Reduktionsmittel.

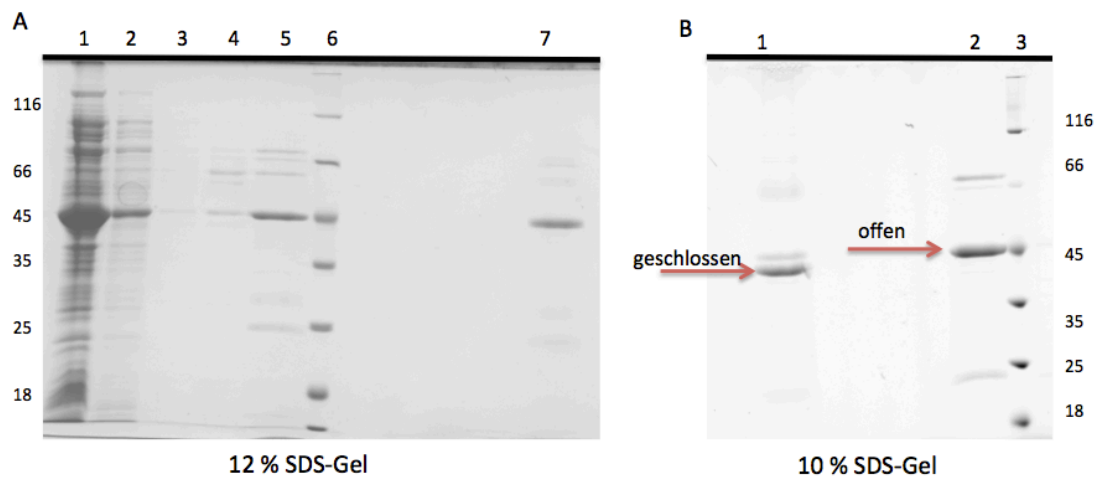


Abbildung 5.18: SDS-Gel-Analyse zur Bildung der Disulfidbrücke von der eIF4A(G70C/R367C). A: 12 % SDS-Gel: Spur 1: Rohlysate, Spur 2: Durchlauf, Spur 3: Wasch I, Spur 4: Wasch II, Spur 5: Elution I, Spur 6: Unstained Protein Marker (kDa); Spur 7: nicht reduziert Elution I; B: 10 % SDS-Gel: Spur 1: nicht reduzierte Elution nach einem Tag, Spur 2: Elution, Spur 3: Unstained Protein Marker (kDa) eIF4A(G70C/R367C): MW von 45 kDa,

Zudem ist in der Probe (Spur 1, Abb. 5.18B) ohne Reduktionmittel eine kleine Bande des offenen eIF4A(G70C/R367C) zu erkennen, da es auf derselben Höhe migriert wie in der Probe (Spur2, Abb. 5.18B) mit Reduktionsmittel. Diese Veränderung zeigt eine Bildung der geschlossenen Konformation.

Um die Veränderung der Elutionsvolumen zu testen, wurde eine Gel-Permeations-Chromatographie (Puffer: 100 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,5) durchgeführt. Das oxidierte eIF4A(G70C/R367C) hat ein Elutionsvolumen von 88 ml (Abb. 5.19A). Der Wildtyp eIF4A hat ein Elutionsvolumen von 79 ml (Abb. 5.19B).

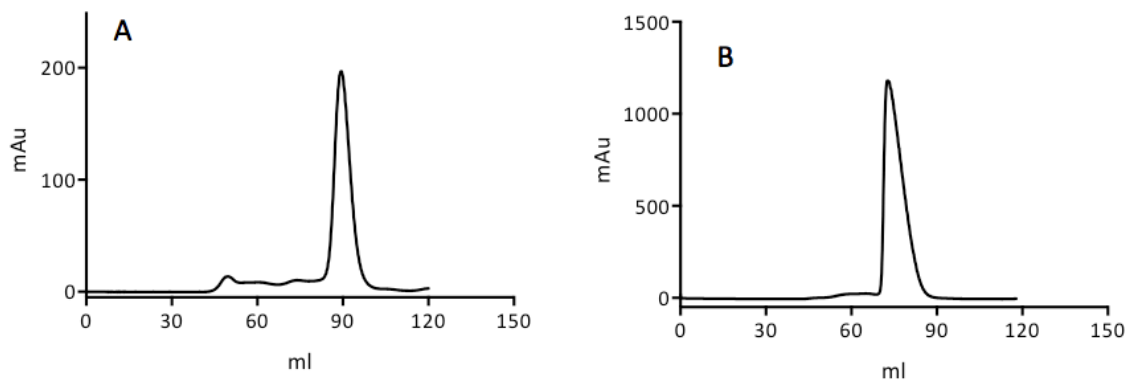


Abbildung 5.19: Vergleich des Laufverhaltens von eIF4A(G70C/R367C) mit eIF4A, A: Elutionsprofil von eIF4A(G70C/R367C), Elutionsvolumen von 88 ml ; B: Elutionsprofil von eIF4A Elutionsvolumen von 79 ml

Die Ergebnisse der nicht-reduzierenden SDS-Gele (Abb.5.18B) und der Gel-Permeations-Chromatographie (Abb. 5.19) belegen daher, dass eine Disulfidbrücke zwischen Cystein 70 und Cystein 367 gebildet wurde. Zudem ist im Elutionsprofil der Mutante eIF4A(G70C/R367C) bei 79 ml ein kleiner *Peak* erkennbar, was auf eine kleine Population mit geöffneter Konformation hinweist (vermutlich nicht-oxidiertes Protein). Die geöffnete und die geschlossene Konformation werden offensichtlich voneinander abgetrennt. Die Mutante eIF4A(G70C/R367C) wurde, wie oben beschrieben, im Weiteren für die Komplexbildung und Kristallisation genutzt, da diese Doppelmutante die Flexibilität für eIF4AI herabsetzen sollte.

5.9.3 Komplexbildung von eIF4A(G70C/R367C) mit eIF4GICD (1426)

Die Komplexbildung von eIF4A(G70C/R367C) mit eIF4GICD(1426) wurde mittels Gel-Permeations-Chromatographie und Bio-Layer-Interferometrie (BLI) untersucht. Der Puffer für die Gel-Permeations-Chromatographie war 100 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,5. Für die Komplexbildung wurde eIF4A(G70C/R367C) mit eIF4GICD(1426) eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Proteingemisch auf HiLoad 16/600 Superdex 200 aufgetragen. Aus dem erhaltenen Elutionsprofil und der zugehörigen SDS-PAGE ist deutlich zu erkennen, dass eIF4A(G70C/R367C) ein Elutionsvolumen von 88 ml und eIF4GICD(1426) von 92 ml aufweist. Das Elutionsprofil (Abb. 5.20) zeigt deutlich, dass die beiden Proteine getrennt, aber bei sehr ähnlichen Elutionsvolumina migrieren.

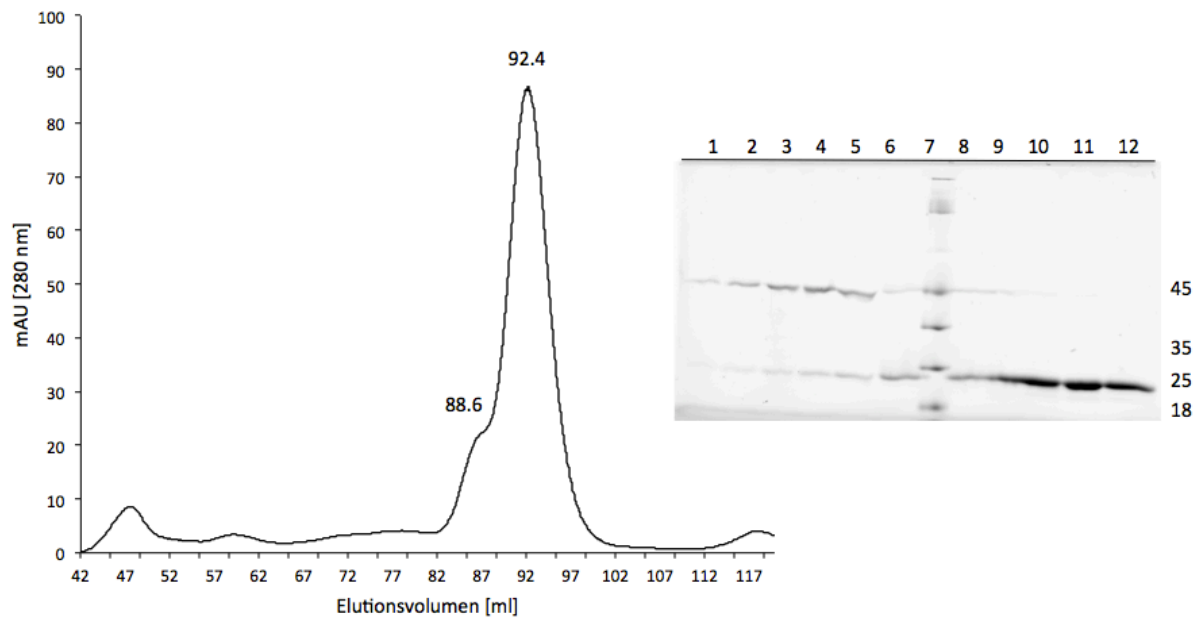


Abbildung 5.20: Elutionsprofil der Komplexbildung eIF4AI(G70C/R367C):eIF4GICD(1426). Das Elutionsvolumen von 88 ml entspricht eIF4AI(G70C/R367C): und das Elutionsvolumen von 92 ml entspricht eIF4GICD(1426). SDS Gel: Spur 1-7 sind Fraktionen von Elutionsvolumen 88 ml, Spur 8: Unstained Protein Marker (kDa), Spur 9-12 Fraktionen von Elutionsvolumen 92.9 ml, ScIF4AI: M_w :45 kDa, eIF4GICD: M_w :25kDa. (Puffer: 100 mM NaCl, 50 mM Tris, pH 7,5)

Damit kann ausgeschlossen werden, dass der Komplex Gel-Permeations-Chromatographie stabil ist, wenn er überhaupt in nennenswertem Umfang gebildet wird.

Zu Überprüfung, ob eine Komplex-Bildung zwischen eIF4AI(G70C/R367C) und eIF4GICD(1426) möglich ist, wurde die Methode Bio-Layer-Interferometrie (BLI, Abschnitt 4.2.12) genutzt. Des Weiteren wurde der Einfluss von der geschlossenen bzw. geöffneten Konformation von eIF4A auf die Komplexbildung mit eIF4GICD(1426) untersucht. Die Konformationsänderung zur geöffneten Konformation von eIF4A wird durch die Zugabe von DTT ermöglicht, dadurch wird die Disulfidbrücke reduziert. Hierzu wurde wie in Abschnitt 4.2.12 vorgegangen mit der Ausnahme, dass die Bindung mit 4 mM DTT und ohne DTT untersucht wurde (Abb. 5.21).

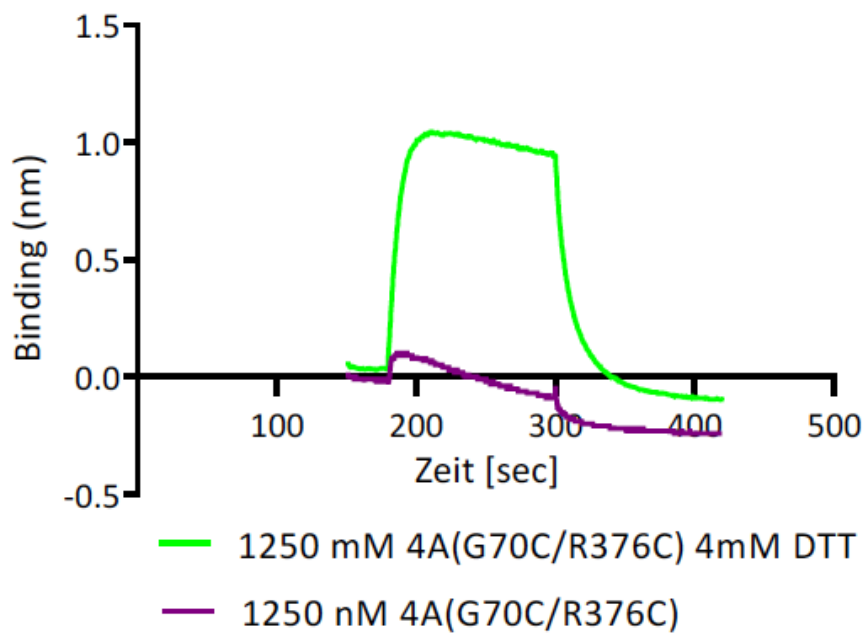


Abbildung 5.21: Bindungsdiagramm von eIF4GICD(1426) (10 μ M) mit 1.25 μ M eIF4A(G70C/R367C), Grüne Bindungskurve: 1.25 μ M eIF4A(G70C/R367C) mit 4 mM DTT (1:1Fit), Violette Bindungskurve: 1.25 μ M eIF4A(G70C/R367C) ohne DTT.

Aus dem Bindungsdiagramm ist erkennbar, dass in der Probe ohne DTT keine Bindung zu eIF4GICD(1426) eingegangen wurde. Die Probe mit 4 mM DTT zeigt jedoch, dass hier eine Bindung stattfand. Für diese Interaktion wurde ein 1:1-Fit (siehe Abschnitt 4.2.12) zur Auswertung genutzt. Der ermittelte K_D lag bei 7.6 μ M. Folglich geht die geschlossene eIF4A(G70C/R367C)-Konformation keine Bindung mit eIFGICD ein, im Gegensatz zu der reduzierten und damit offenen Konformation.

5.10 Homogener TR-FRET-Assay

Anforderungen an einen HT-tauglichen Assay sind (i) eine gutes Signal/Hintergrund-Verhältnis, (ii) ein guter z-Faktor (statistisch signifikant), (iii) DMSO-Toleranz, und (iv) eine spezifische Inhibition, die auch Konkurrenz genannt wird (siehe hierzu detailliert Abschnitt 2.1, 2.1.1). Ebenfalls muss die spezifische Interaktion im Assay untersucht werden, damit eine unspezifische Bindung ausgeschlossen werden kann.

5.10.1 Homogener TR-FRET von Komplex eIF4A:eIF4GCD

eIF4A wurde mittels PCR mit einem Myc-Tag am C-Terminus modifiziert; bei eIF4GICD wurde mittels PCR ein HA-Tag eingeführt. Beide Konstrukte enthielten einen Hexahistidin-Tag für die Reinigung. Anschließend wurden beide Proteine im Assay-Puffer 100 mM NaCl, 50 mM

Hepes, pH 7,4 mittels Dialyse bei gleichzeitigem Thrombin-Verdau zur Entfernung des Tags umgepuffert. Alle getesteten Zusätze wurden dem Reaktionspuffer hinzugefügt (siehe Abschnitt 8.3, Abb. 8.7).

5.10.2 HTR-FRET-Assay von eIF4A-Myc/eIF4GICD-HA

Der erste Schritt bei der Etablierung eines solchen Assays war die Durchführung einer Titration von eIF4A-Myc gegen eIF4GICD-HA, die zur Bestimmung des Hook-Punkts diente. Hierbei wurden eIF4A-Myc und eIF4GICD-HA in den Konzentrationen von 50-1000 nM gemischt. Abbildung 5.22A zeigt bei 500 nM eIF4A-Myc/eIF4GICD-HA ein Maximum des S/B-Verhältnisses von 2/1 bei einer Antikörper-Konzentration von 1 µg/µl. Bei 1000 nM eIF4A-Myc ist eine Abnahme des S/B-Verhältnisses zu beobachten (= *High-Dose-Hook-Effekt*, S.38). Der folgende Schritt war die Durchführung einer spezifischen Inhibition. Hierzu wurden 500 nM von eIF4A-Myc/eIF4GICD-HA für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde eIF4GICD-His in der Konzentration 10-2500 nM dazugegeben und das Signal im Plattenreader ausgelesen.

Die resultierenden Daten (Abbildung 5.22B) zeigen eine Abnahme der relativen Aktivität. Bei 500 nM, d.h. einem 1:1-Verhältnis von FRET-fähigem Akzeptor eIF4GICD und FRET-inhibitorisch wirkendem eIF4GICD, beträgt die relative Aktivität 0,48, was der erwarteten Halbierung des Signals entspricht. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass ein 48 %iger Signalverlust und damit eine Inhibition erfolgt ist.

Der nächste Schritt im HTR-Assay von eIF4A-Myc/eIF4GICD-HA war der Test auf DMSO-Toleranz. Hierfür wurden 500 nM eIF4A-Myc/eIF4GICD-HA mit den beiden Antikörpern mit 1,25-6,25 % (v/v) DMSO für eine Stunde inkubiert und das FRET-Signal anschließend ausgelesen. Aus der Abbildung 5.22C ist deutlich zu erkennen, dass die Anwesenheit von DMSO keinen Einfluss auf das S/B-Verhältnis der Interaktion hat.

Der z-Faktor betrug hier 0,7. Mittels der Qualitätseinstufungen (Abschnitt 2.1.1) kann der Assay als gut klassifiziert werden.

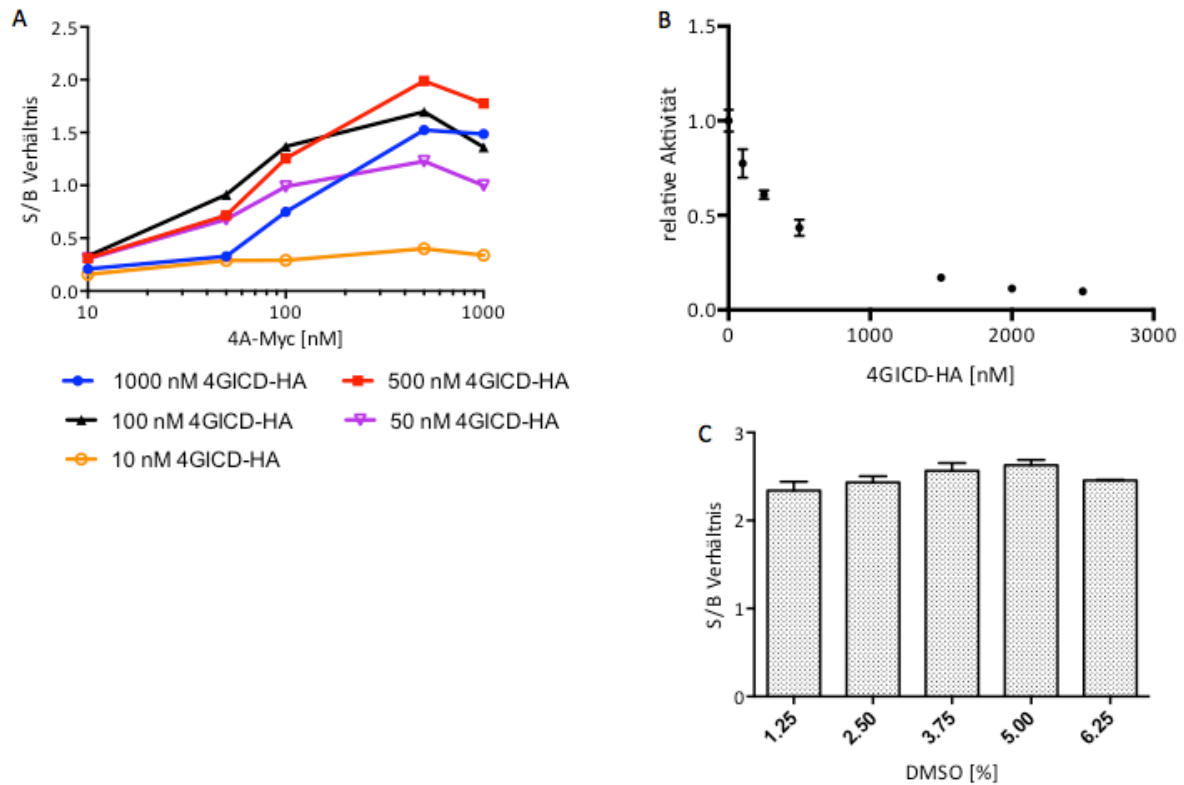


Abbildung 5.22: Darstellung der HTR-FRET-Daten von eIF4A-Myc:eIF4GICD-HA. In den Konzentrationen 10-1000 nM mit den Antikörpern Eu(K)-HA und XL665-Myc im Puffer 100 mM NaCl, 100 mM KF, 50 mM Hepes pH 7,5, 0.01 % Tween, 0.05 % BSA; A: Titration von eIF4A-Myc gegen eIF4GICD-HA, in den Konzentrationen 10-1000 nM, S/B-Verhältnis gegen die Konzentration 10-1000 nM eIF4A-Myc aufgetragen. B: Kompetitiver Assay: 500 nM von eIF4A-Myc/eIF4GICD-HA inhibiert mit in den Konzentrationen von 5-2500 nM eIF4GICD-His. C: 500 nM von eIF4A-Myc/eIF4GICD-HA versetzt mit den 1,25-6,25 % DMSO-Toleranz des Assays.

Problematisch ist das erhaltene Assay-Fenster (S/B-Verhältnis), das mit 2/1 zu gering für die Durchführung eines Hochdurchsatzverfahrens ist.

Deswegen wurden verschiedene Zusätze (BSA, Tween) ausprobiert, wobei jedoch keine Verbesserung des S/B-Verhältnisses erzielt wurde (Abschnitt 8.3, Abb. 8.8). Das zweite Problem stellte die Verwendung des Eu(K)-Antikörpers (Donor-Antikörpers) dar. Dieser braucht zur Signalstabilisierung 100-400 mM Kaliumfluorid im Puffer des Assays. Kaliumfluorid wird nicht als physiologisches Salz betrachtet. Das FMP lässt Kaliumfluorid nicht zu, da es gesundheitsschädlich ist und hohe Kosten bei der Entsorgung aufkommen. Aus diesem Grund wurde der Donor-Antikörper zu Tb-Ha getauscht (Abb. 5.23). Durch den Wechsel des Antikörper-Systems muss eine erneute Titration durchgeführt werden, um den neuen Hook-Punkt zu ermitteln. Es wurde durch die Verdopplung der Antikörpermenge von 1 µg/µl auf 2 µg/µl eine Erhöhung des S/B-Verhältnisses auf 3,5/1 erzielt. Es erfolgte eine

Verschiebung des Hook-Punktes auf 125 nM eIF4A-Myc/eIF4GICD-HA, wodurch eine Verbesserung zu dem anderen Donor-Antikörper -Ha erkennbar wird.

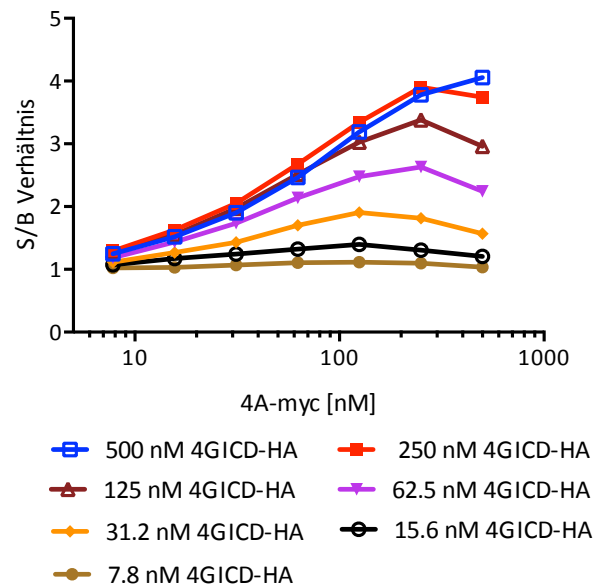


Abbildung 5.23: Darstellung der Titration-Daten von eIF4A-Myc gegen eIF4GICD-HA in den Konzentrationen von 15.6-500 nM mit den Antikörpern Tb-HA und XL665-Myc im Puffer: 150 mM NaCl, 50 mM Hepes pH 7.5, 0,01 % Tween 20, 0,05 % BSA.

Die Verdopplung der Antikörpermenge war jedoch bei der Durchführung des HTR-FRET-Screenings mit einer Zunahme der Kosten verbunden.

5.10.3 HTR-FRET von eIF4A-Myc/eIF4GICD-His

Bei der Assay-Etablierung sollte auch die Möglichkeit des Austausches des Antikörper-Tags in Betracht gezogen werden. Deswegen wurde bei eIF4GICD vom HA-TAG auf den 6XHis-TAG gewechselt. Bei der Titration war erkennbar, dass das S/B-Verhältnis 2,5/1 betrug. Die optimalen Konzentrationen liegen bei 125 nM für eIF4GICD-His und bei 65,2 nM für eIF4A-Myc. Im Vergleich mit dem Myc/HA-System (Abb. 5.24) ist eine geringe Verbesserung des S/B-Verhältnisses zu beobachten.

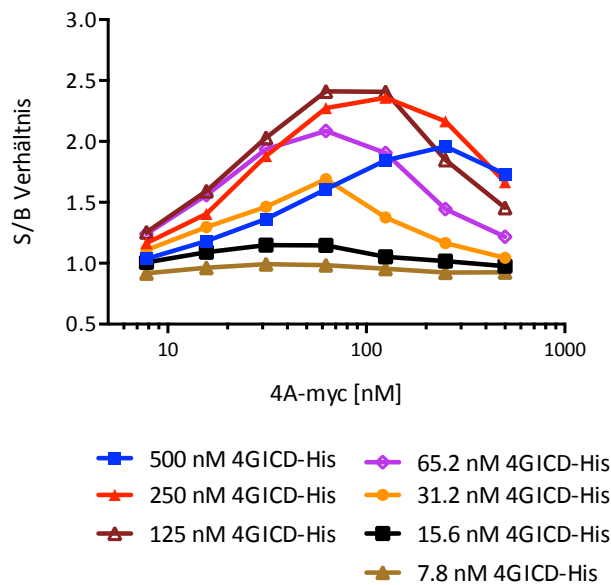


Abbildung 5.24: Darstellung der Titrationsdaten von eIF4A-Myc gegen eIF4GICD-His in den Konzentrationen 7.8-500 nM mit den Antikörpern Tb-His und XL665-Myc im Assay-Puffer 150 mM NaCl, 50 mM Hepes, pH 7,5, 0,01 % (v/v) Tween 20, 0,05 % (w/v) BSA.

Durch den Wechsel des Kaliumfluorid-abhängigen Eu(K)-Antikörpers kann diese Natriumchlorid-Abhängigkeit untersucht werden. Hierzu wurde im Assay die Konzentration von Natriumchlorid von 0-500 mM im Reaktionspuffer variiert. In Abbildung 5.25B ist das erhaltene S/B-Verhältnis gegen die Natriumchlorid-Konzentration aufgetragen.

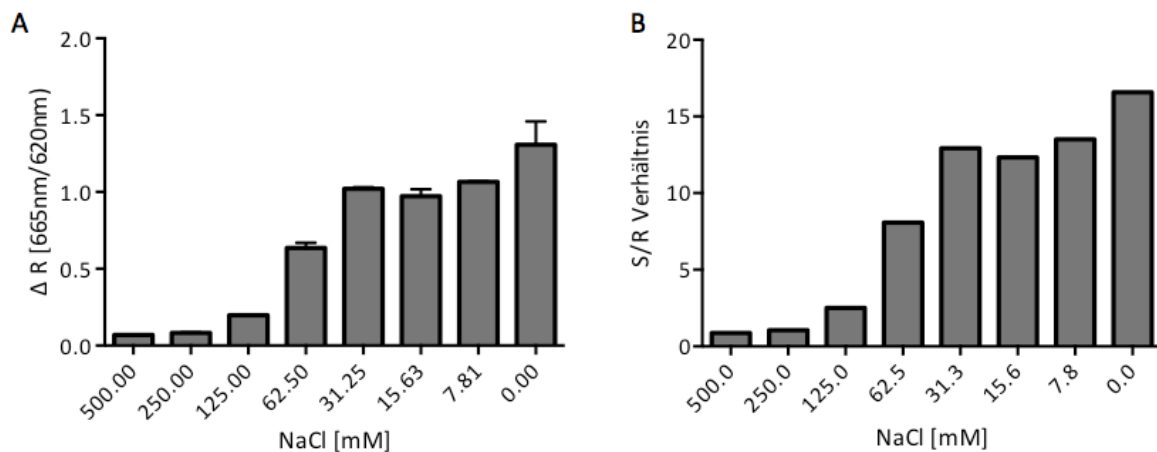


Abbildung 5.25: Darstellung der Natriumchlorid-Titrationsdaten von eIF4A-Myc/eIF4GICD-His mit den Antikörpern Tb-His und XL665-Myc im Puffer: 50 mM Hepes pH 7,5, 0,01 % (v/v) Tween, 0,05 (w/v) %, BSA. A: HTR-FRET-Verhältnis (R) gegen die finale Natriumchlorid-Konzentration [mM]. B: S/B-Verhältnis gegen die finale Natriumchlorid-Konzentration [mM].

Bei 62.5 mM Natriumchlorid ist ein signifikanter Anstieg des S/B-Verhältnisses erkennbar. Bei 0 mM Natriumchlorid zeigt sich ein S/B-Verhältnis von 18/1. Bei Betrachtung des

spezifischen Signals in Abwesenheit von Natriumchlorid ist die höchste Standardabweichung erkennbar. Bei 31.2 mM Natriumchlorid wurden das beste S/B-Verhältnis und eine geringe Standardabweichung erzielt. Um eine unspezifische Interaktion bei 30 mM NaCl auszuschließen, wurde eine Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie durchgeführt (Abschnitt 5.10.4). Diese Messungen wurden von Andreas Oder am FMP in Berlin durchgeführt.

5.10.4 NaCl-Abhängigkeit von eIF4A:eIF4GICD

Für die Untersuchung von Salzabhängigkeit wurde die Methode der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (Surface Plasmon Resonance, SPR) verwendet, um das Bindungsverhalten des Komplexes eIF4A:eIF4GICD bei Natriumchlorid-Konzentrationen von 30 mM und 150 mM zu untersuchen (Abb. 5.26). Dazu wurde eIF4GICD-His als Ligand an einen Ni-NTA-Chip gebunden. eIF4A wurde in den Konzentrationen 3-24 nM zu den gebundenen eIF4GICD-His gegeben. Die Flussrate betrug 30 $\mu\text{l}/\text{min}$.

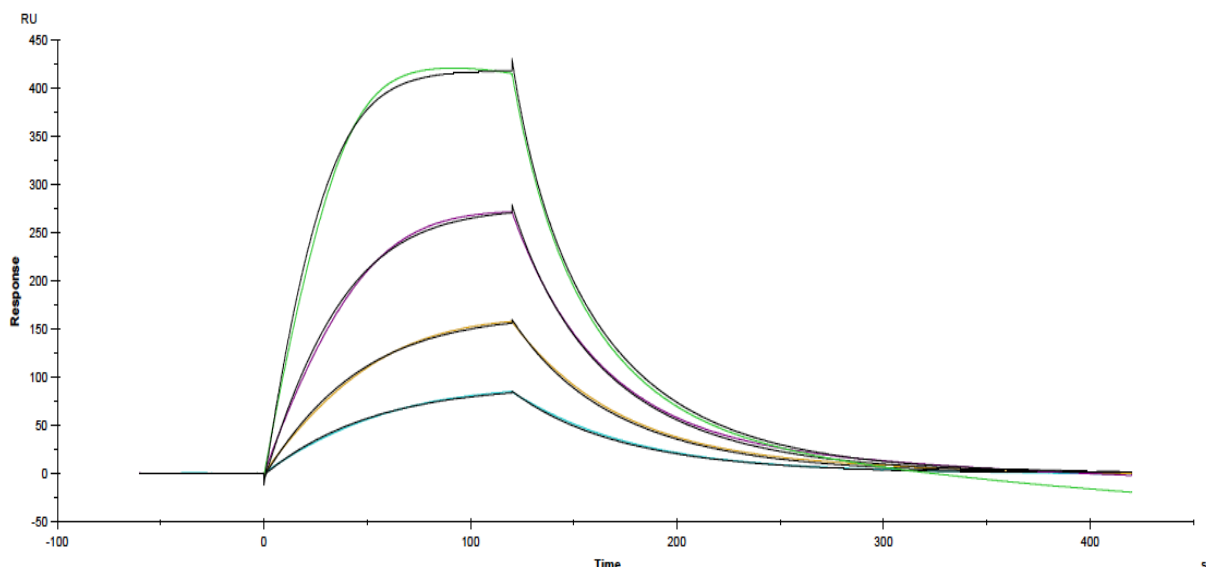


Abbildung 5.26: Bindungsdiagramm von eIF4A:eIF4GICD(1426) mit 30 mM NaCl (Bindungsdiagramm: grün: 24 nM eIF4A-Myc, violett: 12 nM eIF4A-Myc, gelb: 6 nM eIF4A-Myc, blau: 3 nM eIF4A-Myc)

Es ist deutlich zu erkennen, dass der Fit 1:1 in 30 mM Natriumchlorid passt. Die Assoziation (k_a) ist schnell; im Gegensatz dazu ist die Dissoziation (k_d) eher langsam. Der K_D beträgt 25,59 nM (Tab. 5.4).

Tabelle 5.4: Daten aus dem Fit 1:1 mit 30 mM NaCl.

K_D (nM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)
25.59	$2.56E+8 \pm 2.6E+7$	6.54 ± 0.66

Das gleiche Experiment wurde mit 150 mM Natriumchlorid durchgeführt. Hierbei wurden ebenfalls die Konzentrationen 3-24 nM von eIF4A verwendet, um die beiden Experimente besser vergleichen zu können (Abb. 5.27).

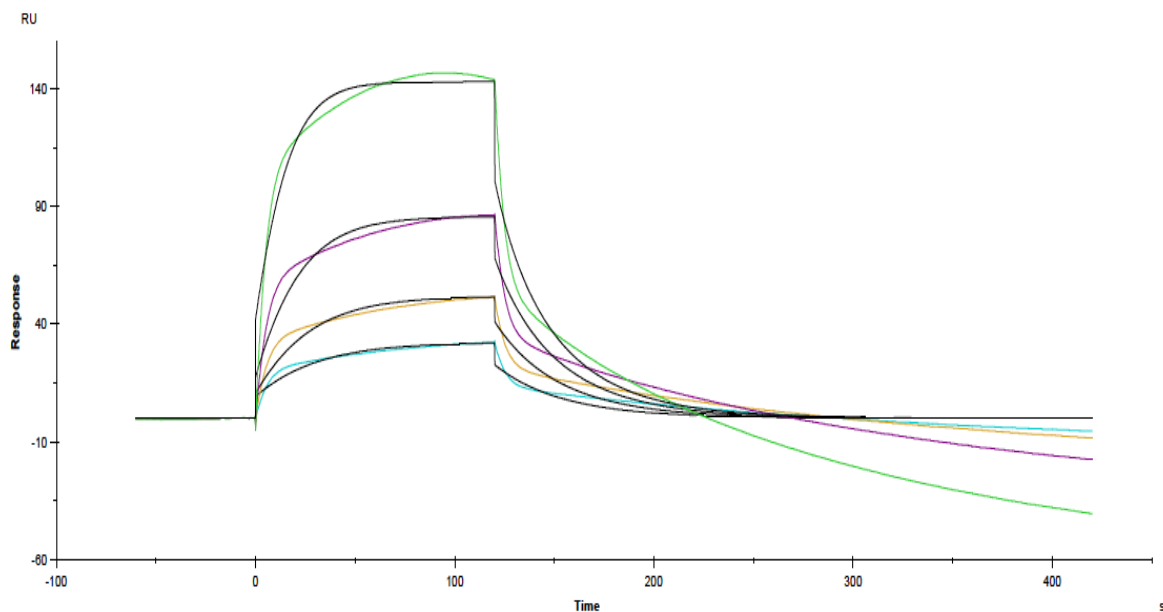


Abbildung 5.27: Bindungsdiagramm eIF4A:eIF4GICD(1426) mit 150 mM NaCl (Bindungsdiagramm: grün: 24 nM eIF4A-Myc, violett: 12 nM eIF4A-Myc, gelb: 6 nM eIF4A-Myc, blau: 3 nM eIF4A-Myc)

Der Fit 1:1 zeigt für diese Parameter signifikante Abweichungen von den gemessenen Daten. Bei der Assoziation ist zu erkennen, dass eine zweite, etwas schnellere Reaktion stattfand, nach der eine Sättigung erreicht wird. Bei allen Daten ist bei der Dissoziation ein schneller Verlauf sichtbar. Hierbei ist ebenfalls zu erkennen, dass die Assoziation eher langsam verläuft. Der Komplex fällt also relativ schnell wieder auseinander (Tab. 5.5).

Tabelle 5.5: Daten aus den Fit 1:1 in Buffer mit 150 mM NaCl

K_D (nM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)
22.25	$3.0E+6 \pm 3.7E+5$	0.067 ± 0.009

Der Vergleich der beiden Messungen zeigt, dass bei der niedrigeren Konzentration von 30 mM Natriumchlorid die Bildung des Komplexes schneller verläuft, aber dafür die Dissoziation des Komplexes verlangsamt ist. Dies ist ebenso deutlich an den verschiedenen *Resonance Units* zuerkennen, welche die Massenbelegung widerspiegeln. Diese ist deutlich höher bei 30 mM NaCl als bei der Messung mit 150 mM Natriumchlorid. Zudem ist aus den Daten von 150 mM Natriumchlorid ein biphasischer Kurvenverlauf zu erkennen.

Folglich haben Veränderung der NaCl-Konzentration einen Einfluss auf die Bindungseigenschaften des Komplexes; es ist kein Klebrigkeitseffekt des Proteins aufgetreten.

5.10.5 HTR-FRET-Signalstabilität von eIF4A-Myc:eIF4AGICD-His

Zur Betrachtung der Signalstabilität wurde das HTR-FRET-Verhältnis (R) (Abschnitt 4.2.14) von eIF4A-Myc:eIF4AGICD-His über 300 Minuten untersucht. Bei der Probe ohne Zusätze war eine deutliche Abnahme des Signals des HTR-FRET-Verhältnisses (R) nach 60 Minuten erkennbar (Abb. 5.28 A). Ebenfalls wurde die Abnahme der Akzeptorfluoreszenz beobachtet (Abb. 5.28 B).

Für ein HT-Screening war es jedoch günstiger, dass das Signal eine Stabilität von mindestens 24 Stunden hat. Deswegen wurden die Signalstabilität unter Zusatz von 1 mM DTT und 1 mM PMSF untersucht. Bei 1 mM PMSF wurde kein signifikanter Einfluss auf das Signal des HTRF-Verhältnisses festgestellt (Abschnitt 8.3 Abb. 8.9). Doch bei der Zugabe von 1 mM DTT zeigte sich eine Stabilisierung des Signals des HTR-FRET-Verhältnisses (R) und der Akzeptorfluoreszenz (Abb. 5.28 A/B).

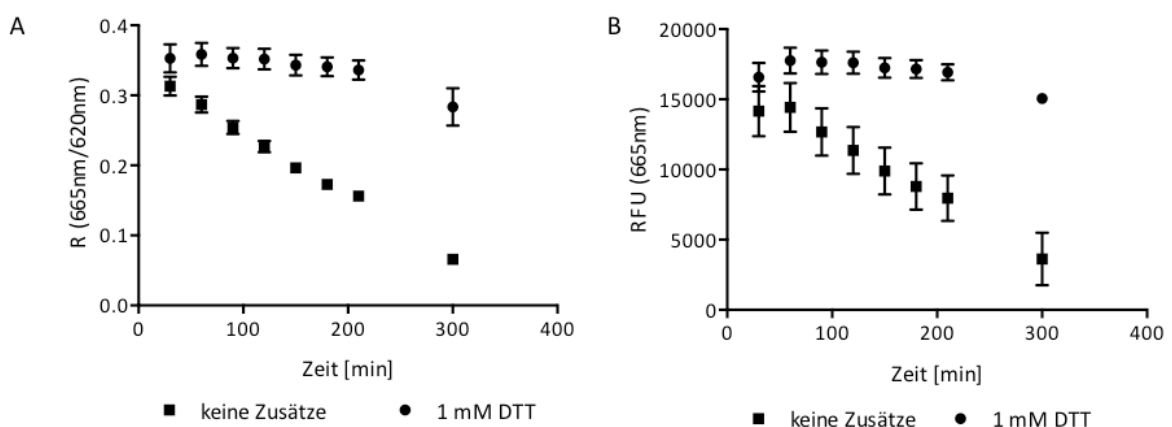


Abbildung 5.28: Darstellung der Signalstabilität des HTR-FRETs von eIF4A-Myc:eIF4AGICD-His. A: Das HTR-FRET-Verhältnis (R) gegen die Zeit ohne Zugabe/mit 1 mM DTT. B: Relative Fluoreszenzeinheit (RFU) des Akzeptors XL665 gegen die Zeit ohne Zugabe/mit 1 mM DTT.

Aus den beiden Daten kann die Erkenntnis gezogen werden, dass die Stabilität des Komplexes eIF4A-Myc:eIF4GICD-His problematisch ist. Durch die Zugabe von 1 mM DTT wurde die Stabilität wieder hergestellt. Eine gute Signalstabilität ist eine Voraussetzung für die Durchführung des Screenings, da mehrere Platten gleichzeitig vorbereitet werden.

Aufgrund der Veränderungen (30 mM NaCl; 1 mM DTT) im Reaktionspuffer musste eine erneute Titration durchgeführt werden. Das resultierende S/B-Verhältnis betrug 12/1 und zeigt, dass der Hook-Effekt nach 31,2 nM von eIF4A-Myc/eIF4GICD-His erreicht wurde (Abb. 5.29). Im Vergleich der S/B-Verhältnisse (Abschnitt 5.10.3) wurde eine Verbesserung erreicht, wodurch die Identifizierung eines Inhibitors verbessert wurde. Und zudem wurde die Konzentration der beiden Proteine verringert, was ebenfalls zu den Kriterien für eine HTS gehört (Abschnitt 2.1).

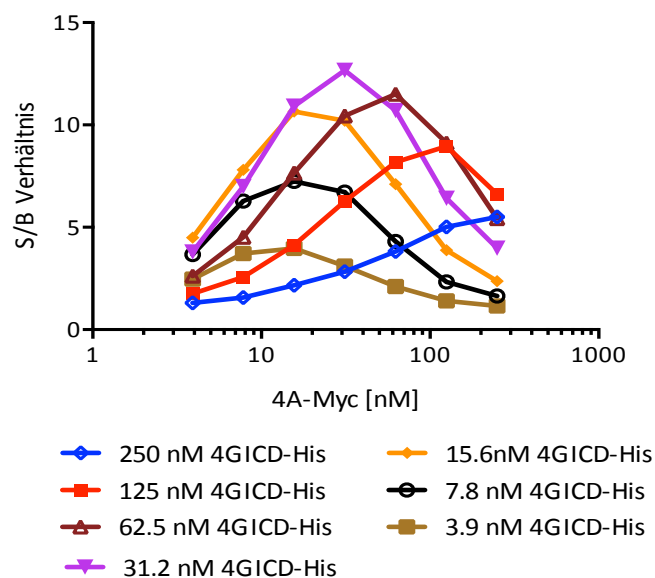


Abbildung 5.29: Darstellung der Titrationsdaten von eIF4A-Myc gegen eIF4GICD-His in den Konzentrationen 3.9-250 nM mit den Antikörpern Tb-His und XL665-Myc im Puffer 30 mM NaCl, 50 mM Hepes pH 7.5, 0.01 % (v/v) Tween 20, 0.1 % (w/v) BSA 1mM DTT.

5.10.6 Spezifität des HTR-FRET-Assays von eIF4A-Myc:eIF4GICD-His

Der letzte Test stellte die Durchführung des spezifischen Inhibitionsexperiments dar (kompetitiver Assay). Hierzu wurde der Komplex eIF4A-Myc:eIF4GICD-His für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde eIF4GICD-HA in den Konzentrationen 10-2500 nM dazugegeben und im Plattenleser ausgelesen.

Die resultierenden Daten (Abb. 5.30) zeigen eine Abnahme der relativen Aktivität (Signalabnahme des HTR-FRET-Verhältnisses (R) bezogen auf die positive Kontrolle, Abschnitt 2.1.2) Auswertung HTR-FRET 4.2.14). Bei 62,5 nM beträgt die relative Aktivität 0,62, was eine

Halbierung des Signals bedeutet. Das bedeutet, dass ein 62 %iger Verlust des Signals erfolgt ist. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass eine Inhibition des Komplexes eIF4A-Myc:eIF4GICD-His durch eIF4GICD-HA erfolgt ist.

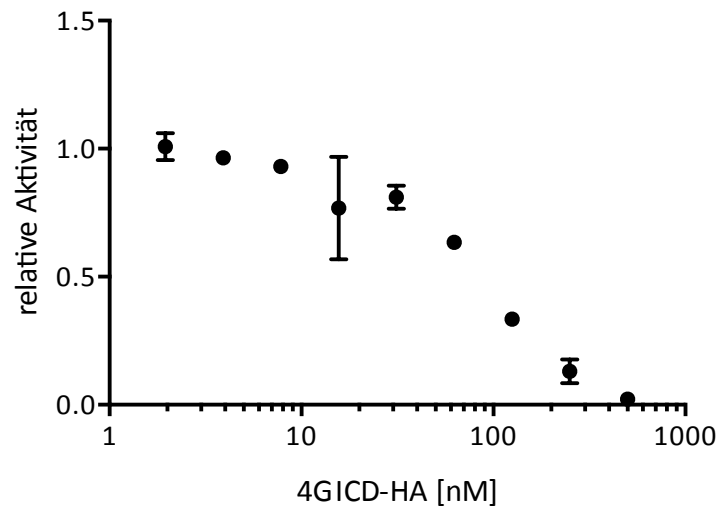


Abbildung 5.30: Kompetitiver Assay: 31.2 nM von eIF4A-Myc/eIF4GICD-His inhibiert mit verschiedenen Konzentrationen eIF4GICD-HA.

Bei diesem Experiment wurde eIF4GICD-HA verwendet, und es wurde das erwartete Ergebnis erzielt. Da die beiden eIF4GICD-Konstrukte keine Veränderungen in der Bindungsoberfläche zeigen, kann von demselben Wechselwirkungsmechanismus ausgegangen werden.

Um die Spezifität des Assays zu testen, wurde eine Variante benötigt, die eine Mutation in der Bindungsoberfläche trägt. Wie im Abschnitt 5.9.3 gezeigt, wurde in dieser Arbeit die Doppelmutante eIF4A(G60C/R367C) hergestellt, die in der oxidierten Form, bei der die geschlossene Konformation vorliegt, keine Bindung zu eIF4GICD eingehen kann. Zur Überprüfung der Spezifität des Assays wurde der Versuchsaufbau des kompetitiven Assays herangezogen.

Hierzu wurden 31,2 nM von eIF4A-Myc/eIF4GICD-HA mit 0-250 nM der eIF4A(G60C/R367C) versetzt, für eine Stunde inkubiert und mittels Plattenleser ausgelesen. Das erhaltene Resultat wurde in die relative Aktivität umgerechnet. Bei 62,5 nM eIF4A(G60C/R367C) wurde ein Aktivitätsverlust von 0,1 beobachtet (Abb. 5.31). Das heißt, dass 10 % des Komplexes durch die Doppelmutante inhibiert wurde. Bei 250 nM eIF4A(G60C/R367C) wurde ein Aktivitätsverlust von 0,3 erzielt, damit wurden hier 30 % des Komplexes inhibiert (Abb. 5.31).

Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass eine Bindung der eIF4A(G60C/R367C)-Mutante an eIF4GICD erfolgt ist, also einen leichten kompetitiven Effekt zeigt.

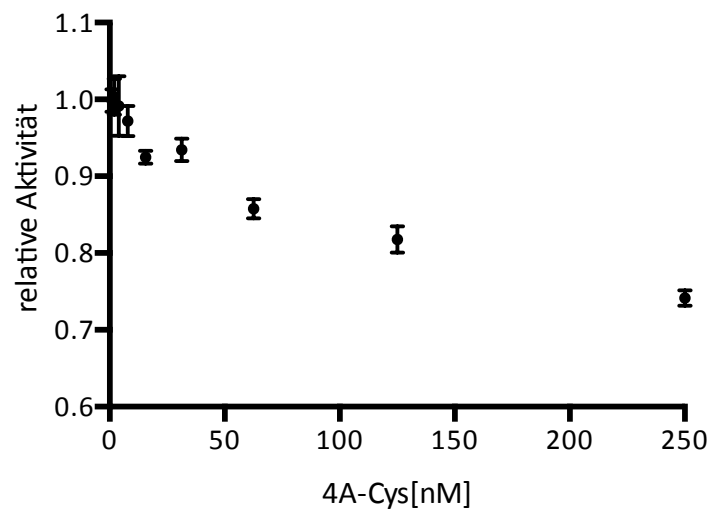


Abbildung 5.31: Kompetitiver Assay von eIF4A(G60C/R367C): 31.2 nM von eIF4A-Myc/eIF4GICD-HA inhibiert mit verschiedenen Konzentrationen eIF4-Cys (eIF4A(G60C/R367C)).

Da der Aktivitätsverlust der Komplexbildung aber keine Halbierung des Signals ergibt, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass die Spezifität des Assays gewährleistet ist.

Der nächste Punkt, damit der Assay bei einem Hochdurchsatz-Screening genutzt werden kann, ist die Bestimmung des z-Faktors, mit dem die Qualität des Assays bestimmt wurde. Hierzu wurden 192 positive Proben und 192 negative Proben gemessen, um über eine statistische Berechnung (Abschnitt 2.1.1) den z-Faktor zu ermitteln. Der z-Faktor für diese Messung beträgt z-Faktor (normal) 0,8841; z-Faktor (robust) beträgt 0,9133. Je besser der z-Faktor ist, also je näher an Eins, umso besser sind die Chancen, bei diesem z-Faktor 0.91 einen Hit (positiver bioaktive Verbindung) zu erhalten. Die vorliegenden Werte werden als exzellent für das geplante Hochdurchsatz-Screening eingeschätzt.

5.11 Pilotscreen von HTR-FRET eIF4A-Myc:eIF4GICD-His

Die Durchführung eines Pilotscreens hat den Sinn, die statistische Verteilung des Assays zu betrachten. Ebenso können Plattenrandeffekte sowie Signalverlust oder eine Verringerung des Assay-Fensters (S/B-Verhältnis) durch den Pilotscreen erkannt werden. Ein weiterer wichtiger Punkt beim Pilotscreen ist das Testen der Proteine auf das verwendete Dispensersystem, um Klebrigkeitseffekte zu erkennen und zu verhindern.

Im Pilotscreen wurden in 368 Wells der Platte alle Komponenten für den HTR-Assay angesetzt. 16 Wells der Platte wurden jeweils mit beiden Antikörpern und eIF4GCD gefüllt und gelten als negative Proben.

Im vorliegenden Fall musste der Pilotscreen ein zweites Mal durchgeführt werden, da der z-Faktor (normal) von 0,46 auf 0,10 gefallen war. Mit diesem z-Faktor konnte der Assay nur als schlechter Assay eingestuft werden. Der Grund für die Verringerung war möglicherweise ein Klebrigkeitseffekt der Proteine, weswegen im Folgenden die *Tips* (Spitzen) des Dispensersystems untersucht wurden (Abb. 5.32).

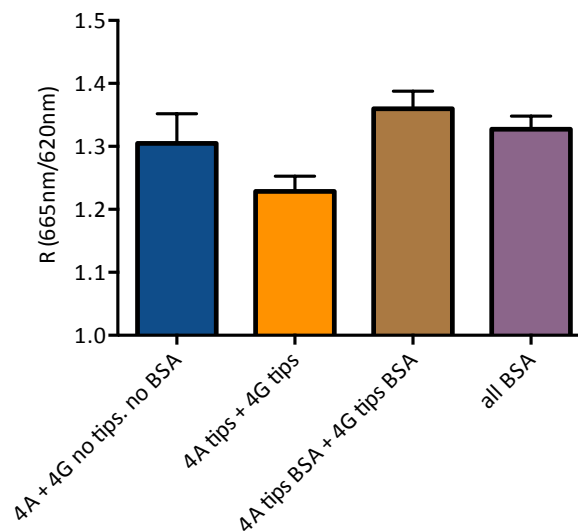


Abbildung 5.32: Klebrigkeitstest von eIF4A-Myc/eIF4GICD-His mit verschiedenen Dispenser-Tips. blau: eIF4A-Myc/eIF4GICD-His ohne BSA, orange: eIF4A-Myc/eIF4GICD-His inkubiert mit Dispenser-Tips, braun: eIF4A-Myc/eIF4GICD-His inkubiert mit Dispenser-Tips, die mit BSA beschichtet sind. violett: eIF4A-Myc/eIF4GICD-His inkubiert mit Dispenser-Tips, die mit BSA beschichtet sind und 0.1 % BSA im Reaktionspuffer.

Im Verlauf dieses Tests wurde der Assay wie oben beschrieben angesetzt, nur dass er mit den Dispenser-Tips zusammen, ohne Tips und mit Tips, die mit BSA beschichtet waren, inkubiert wurde. Anschließend wurde die Signalstärke im Vergleich untersucht. Es konnte eine deutliche Abnahme des Signals bei der Inkubation mit Tips erkannt werden im Vergleich zu der Messung ohne Tips/ohne BSA. Bei der Messung mit Tips zusätzlich mit BSA und 0,1 % BSA im Puffer konnte eine Erholung des Signals erkannt werden. Aus diesem Grund wurde der Pilotscreen wiederholt mit der Verwendung von 0.1 % BSA in Reaktionspuffer. Der z-Faktor (Standard) lag bei dieser erneuten Messung bei 0,78 und z-Faktor (robust) bei 0,88. Mit diesem Wert kann der Assay als exzellent eingestuft werden (Abschnitt 2.1.1).

5.11.1 Primären Screen HTR-FRET eIF4A-Myc:eIF4GICD-His

Für den primären Screen wurde die Bibliothek CBB_1 vom FMP/Berlin mit 16.544 chemischen Verbindungen für HTS verwendet. Diese Bibliothek wurde für Hochdurchsatzverfahren entwickelt. Alle chemischen Verbindungen wurden nach den fünf o.a. Lipinski-Regeln (Abschnitt 2.1) ausgesucht. Die genaue Vorgehensweise findet sich unter Abschnitt 4.2.14.

Der z-Faktor aller 47 Platten betrug 0.97 ± 0.027 ; es zeigte sich eine sehr gute Signaltrennung. Bei der Auswertung der 47 Platten wird die Normalverteilung des Z-Scores der Donor-Fluoreszenz und Akzeptor-Fluoreszenz fokussiert, hierbei können Abweichungen von bioaktiven Substanzen erkannt werden. Bei der Auswertung des Z-Scores der Donor-Fluoreszenz war ein deutlicher Anstieg zu erkennen (Abb. 5.33). Dieses Verhalten führte möglicherweise zu einer Verminderung des Akzeptor/Donor-Verhältnisses, was weiter zu falsch-positiven Hits hätte führen können.

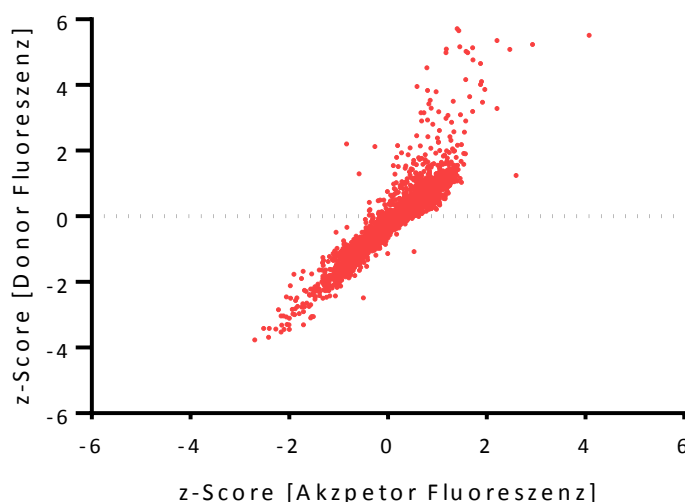


Abbildung 5.33: Diagramm von Z-Score der Donor-Fluoreszenz gegen Z-Score der Akzeptor-Fluoreszenz (Rote Punkte sind alle Messwerte des gesamten Screenings)

Aus diesem Grund wurden Hits ab einem Z-Score von < 4 als schlecht eingestuft, und es wurden 135 Verbindungen aus dem Screen entfernt.

Aus der Normalverteilung (Abb. 5.34) war bei negativen Z-Scores ein Anstieg erkennbar. Daher wurde die Hit-Begrenzung ab einem Z-Score von -4 vorgenommen. Im Ergebnis waren das 352 Hits, worunter sich Verbindungen mit einer relativen Aktivität von 0,8 befanden. Diese Verbindungen hatten eine geringe Wirksamkeit. Zudem wurden 100 weitere Verbindungen herausgenommen, da sie wie oben beschrieben eine Erhöhung der Donor-

Fluoreszenz zeigten. Der komplette Report ist im Anhang beigefügt. Für die Validierung wurden die 252 verbliebenen Verbindungen auf ihren IC50-Wert getestet. Der komplette Report ist im Anhang beigefügt.

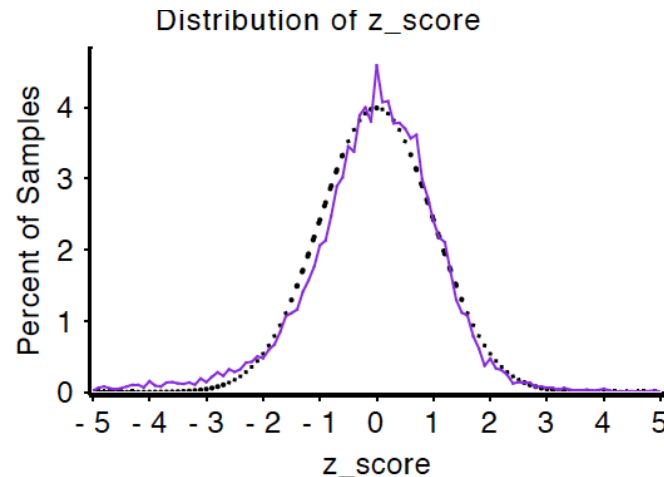


Abbildung 5.34: Verteilung der Z-Scores von 16.544 gemessenen Proben. Lila gibt die Verteilung der Messdaten und die gepunktete Linie die Normalverteilung der Z-Scores an

Aus der Verteilung ist bei negativen Z-Scores ein Anstieg erkennbar. Daher wird die Hit-Begrenzung ab dem Z-Score von -4 vorgenommen. Das Ergebnis sind 352 Hits, darunter befinden sich Verbindungen, die eine relative Aktivität von 0.8 haben. Diese Verbindungen haben eine geringe Wirksamkeit. Zudem werden 100 weitere Verbindungen herausgenommen, da sie wie oben beschrieben eine Erhöhung der Donor-Fluoreszenz zeigten. Für die Validierung werden 252 Verbindungen auf ihre IC50-Werte getestet. Der komplette Report ist im Anhang 8.5 beigefügt.

5.11.2 Validierung von eIF4A-Myc:eIF4GICD-His

Für die Validierung von eIF4A-Myc:eIF4GICD-His wurden die 252 verbliebenen Verbindungen mittels des HTR-FRET-Assays auf ihre IC50-Werte hin untersucht. Es wurde für alle Hits eine serielle Verdünnung durchgeführt, um die einzelnen IC50-Werte zu bestimmen.

Um die falsch-positiven Verbindungen besser von den echt-positiven unterscheiden zu können, wurde die Validierung erneut im Zusammenhang eines Counter-Screens durchgeführt (siehe Anhang 8.5.1). Hierzu wurde das Protein His-eIF4A-Myc verwendet. Dieses enthält die jeweiligen Epitope für die beiden Antikörper. His-eIF4A-Myc wurde mit allen 252 Verbindungen untersucht. Hierbei wurde die Veränderung der Donor- und

Akzeptor-Fluoreszenz untersucht, wobei darauf geachtet wurde, dass keine Verringerung der Donor-Fluoreszenz erfolgte (Abschnitt 5.11.1).

Für die Verbindung FMP-205116 wurde keine Veränderung der Donor- und Akzeptor-Fluoreszenz gefunden. Abbildung 5.34 zeigt die relative Aktivität gegen die Konzentration. Hierzu wurde ein IC₅₀-Wert von $6,6 \pm 1,9 \mu\text{M}$ ermittelt. Hiermit wurde ein neuer Inhibitor, der die Bildung des Komplex von eIF4A:eIF4GICD verhindert, entdeckt.

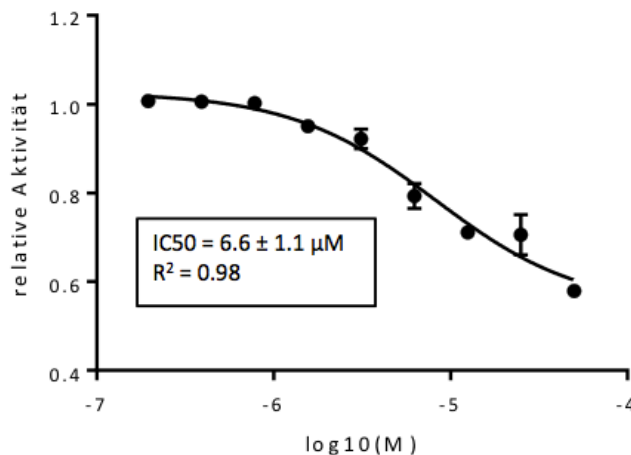


Abbildung 5.35: IC₅₀ Bestimmung von FMP-205116 mittels des HTFRET-Assays.

5.12 Zeit aufgelöster FRET von eIF4A:eIF4GMD

Auch für die Interaktion von eIF4A mit eIF4GMD sollte ein HTR-FRET-Assay etabliert werden. Hierzu wurden die Konstrukte His-eIF4A und GST-eIF4GMD verwendet. Diese Proteine wurden anhand der jeweiligen Affinitätschromatographie-Protokolle aufgereinigt. Anschließend wurden die Proteine in dem Assay-Puffer 50 mM Hepes, pH 7,5, 1 mM DTT dialysiert. Für diese Interaktion wurden der Donor-Antikörper His-Eu und der Akzeptor-Antikörper XL665-GST angewendet. Den ersten Schritt der HTR-FRET-Assay-Etablierung stellte eine Titration dar, um die optimale Konzentration der Analyten herauszufinden. Aus den Daten der Titration wurde ersichtlich, dass der Hook-Effekt nach 50 nM von His-eIF4A/GST-eIF4GMD auftrat (Abb. 5.36A) und ein S/B-Verhältnis von 2.5/1 erhalten wurde. Im nächsten Schritt wurde das Assay auf seine Spezifität hin untersucht (Abb. 5.36B). Hierzu wurde eIF4MD mittels Verdau durch die viralen Proteasen HRV3C vom GST-Tag befreit. Der Komplex wurde in der finalen Konzentration von 40 nM His-eIF4A/GST-eIF4GMD vorlegt und mit steigender Konzentration von 0-250 nM 4GMD versetzt. Ein absteigender Kurvenverlauf der relativen Aktivität als Ausdruck einer Inhibierung. Bei der Konzentration von 80 nM von eIF4GMD wurde ein 50 %iger Signalverlust erreicht. Um die DMSO-Toleranz

(Abb. 5.36C) zu überprüfen, wurde die DMSO-Konzentration im Bereich 0-3 % (v/v) variiert. Aus den Daten ist ersichtlich, dass DMSO keinen Einfluss auf die Komplexbildung nimmt. Aus 25 negativen und positiven Proben wurde ein z-Faktor von 0,5 ermittelt. An Hand dieses z-Faktors (Abschnitt 2.1.1) wurde dieser Assay als gut eingestuft.

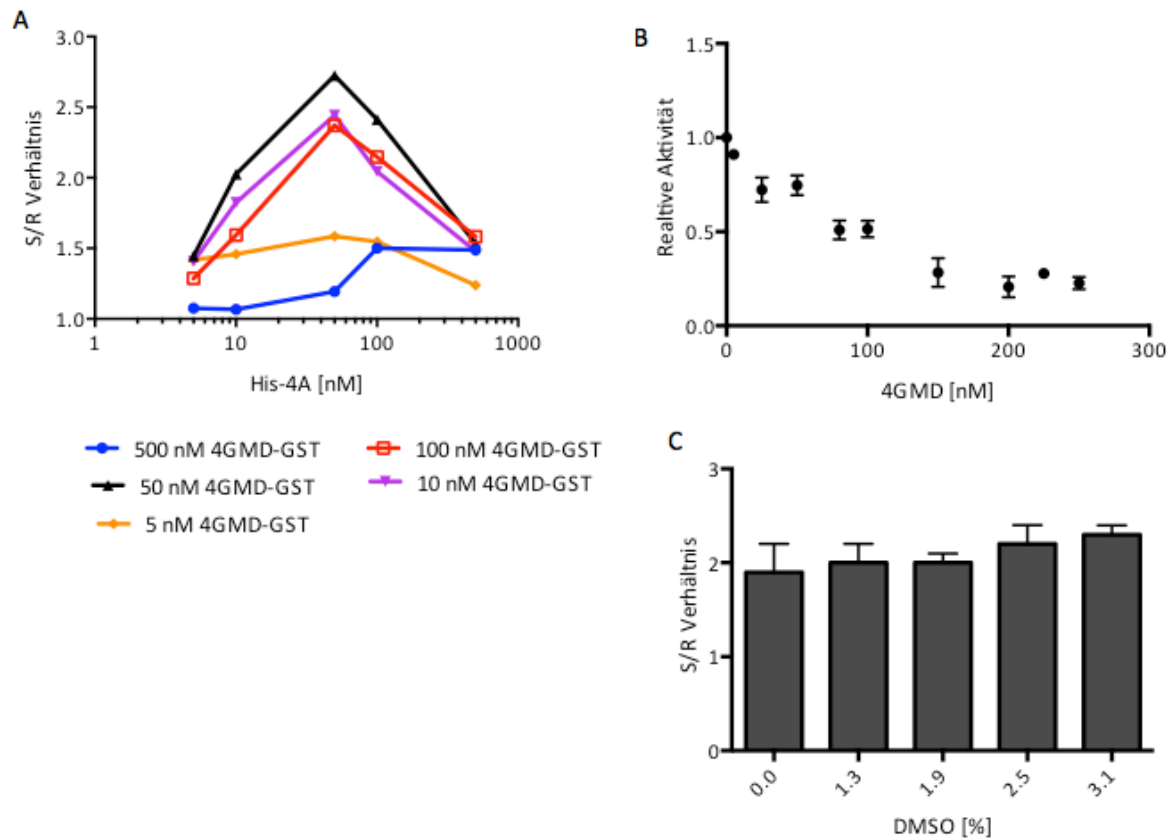


Abbildung 5.36: Darstellung der Daten von HTR-FRET von eIF4AI-His:eIF4GIMD-GST mit den Antikörpern Eu(K) - His und XL665-GST im Puffer: 100 mM KF, 50 mM Hepes pH 7.5, 0.01 % Tween, 0.05 % BSA. A: Titration von eIF4A-Myc gegen eIF4GICD-HA, S/B Verhältnis gegen die eIF4A-Myc [nM] B: Kompetitiver Assay: 50 nM von eIF4A-Myc/eIF4GIMD-GST inhibiert mit verschiedenen Konzentrationen eIF4GMD, C: DMSO-Toleranz des HTR-FRET-Assays.

6 Diskussion

6.1 Biochemische Untersuchungen von eIF4A:eIF4GICD

Die vorgestellte Charakterisierung des Komplexes zeigt, dass es sich zwischen beiden Proteinen um eine relativ starke Interaktion mit K_D -Werten im niederen μM -Bereich handelt, was einen vielversprechenden Ansatz für die Aufklärung einer Kristallstruktur des Komplexes darstellt. Die Änderung der Anreicherungsmethode zur Co-Purifikation resultierte aber in einem besseren Kristallisationsverhalten, da hierbei die Stabilität von eIF4A verbessert werden konnte; diese erhöhte Stabilität im Komplex konnte durch Schmelztemperaturanalyse nachgewiesen werden (Abschnitt 5.1.1).

Die vorliegende Studie legt auch nahe, dass beide untersuchten Proteine, insbesondere aber humanes eIF4A, eine relativ niedere Stabilität bezüglich der Aggregation aufweisen.

Zudem ist bekannt, dass eIF4A (allgemein alle DEAD-BOX-Helikasen) mit 300-500 mM NaCl/KaC-Konzentrationen stabilisiert wird, leider findet bei dieser Bedingung keine Bindung zu eIF4GICD mehr statt [32]. Diese Erkenntnis kann auch durch den Schmelzpunkt von 49°C von eIF4A bei 500 mM NaCl belegt werden (Daten in Anhang 8.1; Abb. 8.5). Abschließend können die so bestimmten Schmelzpunkte von eIF4A und eIF4GICD(1572) mit den Circular dichroismus (CD)-Spektroskopie-Temperatur-Daten von Fujita et al. [30] verglichen werden, diese sind identisch. Hier wurde für eIF4A eine Übergangstemperatur von 44°C und für eIF4ICD von 53°C gefunden (Puffersystem: 5 mM HEPES pH 7.4). Durch die Schmelztemperaturanalyse wurde in dieser Studie gezeigt, dass alle Proteine richtig gefaltet sind, obwohl sie in *E. coli* exprimiert wurden (Abschnitt 5.1.1).

Durch die Verkürzung von eIF4GICD(1426) wurde gezeigt, dass die C-terminale Domäne von eIF4GICD(1422-1572) keine Interaktionsfläche für eIF4A ist (Abb.5.6, Abschnitt 5.4).

Weiter kann die Mutation von Lysinen und Glutamaten einen Einfluss auf die Faltung von eIF4A (Oberflächenentropie-Reduktionsmutanten, Abschnitt 5.3.2) ausüben, wodurch Interaktionen von α -Helizes oder β -Faltblättern zerstört worden sein können.

Dieser Ansatz könnte ebenfalls die Entstehung von Proteinaggregaten (*Inclusion Bodies*) erklären. Eine Methode, um eine solche Aggregation von Proteinen zu vermeiden, ist die Mutation von Cysteinen auf der Oberfläche. Dieser Zusammenhang kann aus den Daten des HTR-FRET-Assays von eIF4A:eIF4GICD(1426) geschlossen werden, da hier durch Zugabe von

1 mM DTT der Signalverschluss des HTR-FRETs verhindert wurde, der durch die Aggregation von eIF4A und eIF4GICD(1426) verursacht worden war (Abschnitt 5.10.5).

Die Verkürzung von eIF4GICD(1426) führt zu besserem Kristallisationsverhalten und erhöhter Stabilität und Ausbeute.

Mit dem verkürzten Konstrukt von eIF4GICD(1426) wurde mit der Methode der Bio-Layer-Interferometrie (BLI) ein K_D von 198 nM ermittelt (Abschnitt 5.7). Dieser Wert entspricht demjenigen von Fujita et al., die für den Komplex eIF4A:eIF4ICD(1040-1599) mittels SPR-Spektroskopie einen K_D von 487 nM bestimmten. Die SPR-Spektroskopie-Daten (K_D =22-25 nM) des FMP aus der vorliegenden Studie können jedoch nicht als Vergleich herangezogen werden, da hier die Konzentrationen im niedrigen nanomolaren Bereich liegen und keine Konzentrationen oberhalb des K_D gemessen wurden. Durch die BLI konnte in diesem Bereich keine Bindung mehr gemessen werden. Die SPR-Spektroskopie-Daten wurden jedoch zur Untersuchung der Klebrigkeitseffekte verwendet (Abschnitt 5.10.4).

In Allgemeinen ist zur Kristallisation zu sagen, dass die Optimierungsschritte zwar einen positiven Effekt auf die Kristallbildung hatten, aber dennoch keine Struktur bestimmt werden konnte. Der Grund hierfür ist nicht ganz klar, da der Komplex eine sehr gute Monodispersität aufweist; eine mögliche Erklärung liegt in der Flexibilität der eIF4A-Komponente. Zudem könnte die Stabilität von eIF4A ein Problem darstellen, da bei der Ultrazentrifugation eine vermehrte Aggregation aufgefallen ist. Des Weiteren kam es bei der Aufreinigung von His-eIF4A-Myc/His-eIF4A (Abschnitt 8.3) zur Aggregation. Aus diesem Grund wurde bei der Aufreinigung von His-eIF4A-Myc für das Screening am FMP/Berlin auf die Ultrazentrifugation verzichtet.

Die hier ermittelten Werte für die Aktivierung der ATPase von eIF4A durch die mittlere Domäne eIF4MD(710-1060) sind vergleichbar mit den Daten von Schütz und Bumann et al. [37]. Die hier vorgelegten ATPase-Werte des Komplexes eIF4GICD(1426) lassen eine Inhibierung der ATPase-Aktivität vermuten. Wir zeigen, dass die Verkürzung des ursprünglichen Konstrukts eIF4GICD(1572) keinen Einfluss auf die Inhibierung von eIF4A hat: bei der Zunahme der Konzentration von eIF4GICD(1426) zeigt sich auch eine Zunahme der Inhibierung von eIF4A. Bei einem 1:1-Verhältnis ist eine Verringerung der ATPase-Aktivität um 70 % zu erkennen, bei einem Verhältnis von 2:1 (eIF4GICD:eIF4A) eine Verringerung der Aktivität um 87,5 % (Abschnitt 5.6). Dieses Verhalten der ATPase-Aktivität zeigt einen Hinweis auf die Modulationsfunktion [29, 33] von eIF4GCD bei der Translationsinitiation.

Aus den SPR-Spektroskopie-Daten (Abschnitt 5.10.4), welche am FMP/Berlin ermittelt wurden, war bei 30 mM NaCl eine Abnahme der Dissoziationskonstante zu erkennen, was eine Verlangsamung des Komplexzerfalls darstellt. Diese Eigenschaft sollte direkt von Anfang an bei der Aufreinigung des Komplexes berücksichtigt werden. Ein Verbesserungsvorschlag für die Co-Aufreinigung wäre folglich, eine Veränderung der Natriumchloridkonzentration von 150 mM auf 30 mM durchzuführen. Zudem sollte die Anstrengung unternommen werden, die beiden Proteine durch eine Co-Expression in *E. coli* zu erhalten, um direkt einen Komplex zu bilden und anschließend aufzureinigen.

Bei der Kristallisation der Proteine wurden die Methoden Vapour-Diffusion und Counter-Diffusion verwendet. Die Durchführung der *CrystalHarp* ist einfach in der Handhabung und kann für das Screening nach Kristallen verwendet werden. In dieser Studie konnten jedoch keinerlei Diffraktionsdaten bei Raumtemperatur oder unter cryogenen Bedingungen erzielt werden. Im Vergleich der Temperaturen 4° und 20°C kann durch die vorliegende Arbeit gefolgert werden, dass die Kristalle bei 4°C kleiner und dünner sind als bei 20°C (Abschnitt 5.5.2, Abb. 5.10/5.11). Die Verwendung des Temperaturbereichs 24 bis 30 °C als Kristallisationsbedingung könnte ein Ansatzpunkt für weiterführende Studien sein.

Es kann zusammenfassend gefolgert werden, dass der Komplex eIF4A:eIF4GICD(1426) (Abschnitt 5.5.3) zwar kristallisiert werden kann, allerdings mit schlechter interner Ordnung. Eine Verlangsamung des Kristallwachstums kann jedoch durch Verringerung der Proteinkonzentration erreicht werden. Hierbei sollten Konzentrationen zwischen 1 und 2,5 mg/ml gewählt werden. Aus der Beobachtung von Kristallisationsexperimenten der Komplexe eIF4A:eIF4ICD(1572) und eIF4A:eIF4ICD(1426) folgt, dass die Kristallisationstropfen nicht direkt nach dem Ansetzen präzipitiert sind, sondern erst nach 24 Stunden. Durch Zugabe von Wasser konnte die Präzipitation in der vorliegenden Studie aufgehoben werden, was *ergo* keinen Rückschluss auf irreversible Aggregation erlaubt.

Aus dem instabilen Aggregationsverhalten von eIF4A resultierte die Idee zur Verwendung des Hefeproteins (*Saccharomyces cerevisiae*), welches stabiler ist. Jedoch ist auch auf dem entsprechenden Elutionsprofil (Abb.5.16) zu erkennen, dass die beiden Proteine keinen Gel-Permeations-Chromatographie-stabilen Komplex bilden. Wir bestätigen damit Schütz und Bumann, die zeigten, dass keine Aktivierung von ScIF4A durch humanes eIF4GMD möglich ist [37]. Für die Cap-abhängige Translationsinitiation ist bei *Saccharomyces cerevisiae*

bekannt, dass das Hefeprotein eIF4G keine C-terminale Bindungsstelle für eIF4A enthält. Vermutlich bilden daher humanes eIF4GICD und das Hefeprotein ScElF4A keinen Komplex.

Um eine Verbesserung der Kristallisation von eIF4A:eIF4GICD zu erreichen, wurde für die Stabilisierung von eIF4A eine Verlinkung über eine Disulfidbrücke eingefügt (Konstrukt eIF4AI(G70C/R367C; siehe Abschnitt 5.9). Die Mutante eIF4AI(G70C/R367C) bildete nach einem Tag die Disulfidbrücke überwiegend aus; dennoch war aus der SDS-Gel-Analyse zu erkennen, dass die geöffnete Konformation immerhin noch zu ca. 8 % vorhanden war. Eine Eliminierung der geöffneten Konformation wäre z.B. durch die Expression in BL21(DE3) in Origami 2 möglich. Dieser *E. coli*-Stamm ermöglicht die Bildung von Disulfidbrücken. Es könnten dann in der Folge Kristallisationsexperimente durchgeführt werden, um die Struktur einer geschlossenen Konformation von eIF4A zu erhalten.

Mittels Gel-Permeations-Chromatographie konnte in der vorliegenden Studie die geöffnete Konformation von der geschlossenen Konformation eIF4AI(G70C/R367C) getrennt werden (Abbildung 5.19, Abschnitt 5.9.2), da sich offensichtlich der hydrodynamische Radius durch die Bildung der S-S-Brücke verändert hatte. Die Veränderung des hydrodynamischen Radius kann darüber erklärt werden, dass die N- und C-terminalen Domänen in der geöffneten Konformation von eIF4A durch den *Linker* gestreckt werden und möglicherweise eine ellipsenartige Form aufweisen, also einen größeren hydrodynamischen Radius. Im Gegensatz dazu hat eIF4A(G70C/R367C) eine „kugeligere“ Form, d.h. einen kleineren hydrodynamischen Radius, und migriert daher langsamer.

eIF4AI(G70C/R367C) wurde hergestellt, um im Komplex mit eIF4GICD(1426) kristallisiert zu werden. Jedoch zeigte sich in den in Abschnitt 5.9.3 beschriebenen Experimenten, dass eIF4AI(G70C/R367C) in der oxidierten Form keine Komplexbildung mit eIF4ICD(1426) mehr eingeht. Durch eine Reduktion der Disulfidbrücke wurde die Bindungskapazität wiederhergestellt, woraus geschlossen werden kann, dass die Seitenkettenaustausche an und für sich keinen wesentlichen Einfluss auf die Komplexbildung nahmen. Allerdings betrug der K_D -Wert von eIF4AI(G70C/R367C):eIF4GICD(1426) 7,6 μ M im Vergleich zu 195 nM von eIF4A:eIF4GICD(1421). Dieser große Unterschied erklärt sich möglicherweise dadurch, dass DTT kein allzu starkes Reduktionsmittel ist [84].

Bei der zusätzlichen Betrachtung der Daten aus dem nativen Gel (Abschnitt 5.4, Abb. 5.7) konnte gezeigt werden, dass bei eIF4AI eine Abnahme des hydrodynamischen Radius bei der Bindung zu eIF4GICD stattfindet. Aus diesen Ergebnissen kann die folgende Hypothese

erstellt werden: eIF4GICD bindet beide N- und C-terminalen RecA-Domänen von eIF4A und bevorzugt eIF4A in einer geöffneten Konformation, welche jedoch einen kleineren hydrodynamischen Radius aufweist als freies eIF4A in Lösung. In dieser halb-geöffneten Konformation von eIF4A ist die Affinität zu mRNA geringer als in der geschlossenen Konformation [85]. So kann der inhibierende Effekt von eIF4GICD auf eIF4A erklärt werden. Aus allen aufgezählten Ergebnissen geht die Bedeutung der Strukturanalyse von eIF4A:eIF4GICD hervor, da nur durch diese ein detaillierter Einblick in die Bindung von eIF4GICD mit eIF4A gewonnen werden kann.

6.2 Hochdurchsatzverfahren vom HTR-FRET-Assays eIF4A:eIF4GICD

Die Etablierung des HTR-FRET-Assays wurde in der vorliegenden Studie erfolgreich durchgeführt. Dieser Assay erfüllt alle Kriterien, die für ein Hochdurchsatz-Screening notwendig sind. Es wurde eine Verbesserung des Signal/Hintergrund-Verhältnisses von 2,5 auf 12 erzielt (Abschnitte 5.10.2-5.10.5). Zudem wurde der z-Faktor von 0,7 auf 0,94 verbessert (Abschnitte 5.10.2-5.11.1). Ebenfalls wurde eine Reduzierung der verwendeten Menge an Proteinen erreicht (Abschnitt 5.10.5). Zudem konnte gezeigt werden, dass eine spezifische Interaktion vorliegt. In Abschnitt 5.10.6 wurde mittels der Doppelmutante eIF4AI(G70C/R367C) die Inhibierung des FRET-Signals untersucht, hierbei wurde eine leichte Inhibierung (10 % bei 62,5 nM) festgestellt. Dieses Verhalten kann dadurch erklärt werden, dass 10 % der geöffneten Konformation von eIF4AI(G70C/R367C) im Assay vorlagen.

Bei der Durchführung des Hochdurchsatz-Screenings am FMP/Berlin wurden 16.544 Substanzen durchsucht, wobei zehn positive Hits identifiziert werden konnten (Abschnitt 5.11.2). Im Verlauf des primären Screens und der Validierung wurde auch eine Erhöhung der Donor-Fluoreszenz beobachtet (Abschnitt 5.11.1-5.11.2). Ein Grund für diese Zunahme kann in Bibliothekssubstanzen liegen, die Emission und Anregung der Fluoreszenz beeinflussen. Diese Substanzen sind nicht mit dem HTR-FRET-Format kompatibel [86]. Für das Herausfiltern dieser Verbindungen wurde der Counter-Screen (Abschnitt 5.11.3) durchgeführt.

Als Ergebnis dieses Prozesses konnte aus den 16.544 untersuchten Substanzen die Verbindung FMP-205116 mit einem IC₅₀ von 6,6 µM ± 1.2 erhalten werden. Diese Verbindung erweist sich in unserer Studie erstmals als Inhibitor für den Komplex eIF4A:eIF4GICD.

Diese Substanz sollte zukünftig für eine bessere Validierung mittels EnzChek® Phosphate Assay Kit und BLI-Messungen untersucht werden. Im Phosphat-Assay wäre eine Zunahme der ATPase-Aktivität zu erwarten, da bei Zerfall des Komplexes die inhibierende Wirkung von eIF4GICD aufgehoben wird. Bei der BLI-Messung kann eine Veränderung des K_D -Werts für den Komplex eIF4A:eIF4GICD erkannt, wodurch ein IC50-Wert für die Verbindung ermittelt werden kann. Dieser IC50-Wert wäre im Folgenden sicherlich durch chemische Modifikation der Verbindung zu verbessern, nämlich im nM-Bereich.

Nach Verbesserung des Inhibitors könnten die folgenden Methoden verwendet werden, um den Inhibitor auf die Wirkung in Krebszellen zu untersuchen. Der Inhibitor würde die Translationsinitiation der Cap-abhängigen mRNA verhindern und dadurch die IRES-vermittelte Translationsinitiation bevorzugen. Für dieses Procedere kann man auf ein bicistronisches Reporterplasmid für die Renilla-Luciferase zurückgreifen [55], mit dessen Hilfe die Luciferase-Aktivität der Zellen gemessen werden kann.

Eine weitere Möglichkeit wäre die Untersuchung der Proliferationsrate von Krebszellen, da die Translationsinitiation mit dieser in Zusammenhang steht. Zu diesem Zweck kann eine 24-Stunden-Behandlung von Krebszellen (z.B. KOPT-K1 Zellen) mit der optimierten chemischen Verbindung von FMP-205116 durchgeführt werden, gefolgt von anschließendem Aufschluss der Zellen und Western-Blot-Analyse. Mithilfe dieses Vorgehens kann das Expressionslevel von Wachstumsfaktoren (CyclinD1) im Vergleich zu den Haushaltsgenen untersucht werden. Ebenfalls können Polysomen [87] (Polyribosomen) isoliert werden und der Unterschied zwischen behandelten Zellen und Kontrolle verglichen werden. In diesem Zusammenhang kann auch die Caspase-Aktivität in Hinblick auf die Apoptose der Krebszellen untersucht werden.

Eine ebenfalls gute Verwendung für die Testung von Inhibitoren ist die Messung der Zellviabilität, welche mittels Mikroskop, Fluoreszenz-Färbung oder der Bestimmung der enzymatischen Aktivität bestimmt werden kann. Mit diesen Methoden wäre es auch möglich, die Toxizität der Verbindung zu untersuchen. Für diese *in vivo*-Experimente muss die Verbindung eine sehr gute bis gute Membranpermeabilität haben.

6.3 HTR-FRET-Assay von Komplex eIF4A:eIF4GMD

Bei der Störung der Ausbildung des eIF4A:eIF4GMD-Komplexes kam es in der vorliegenden Studie zum kompletten Verlust der Cap-abhängigen Translationsinitiation. Der anvisierte HTR-FRET-Assay zeigt zurzeit offensichtlich noch verschiedene Probleme, die verbessert werden müssen. Bei diesem Assay muss z.B. die Proteinstabilität von eIF4MD verbessert werden, da bei einer Lagerung des Proteins ein Abbau zu erkennen ist. Ein weiteres Problem hierbei ist, dass eIF4A und eIF4GMD zu schneller Aggregation neigen und deswegen zu großen Abweichungen bei der Titration führen können.

Bei der erneuten Durchführung des Assays müsste das verwendete Plastikmaterial (Plattenmaterial) auf die Bindungsfähigkeit für die verwendeten Proteine getestet werden, da hier möglicherweise eine unspezifische Absorption stattfindet und der Assay so gefährdet werden kann.

Der Unterschied in der Proteinstabilität ist im HTFR-Assay besonders deutlich bemerkbar. Das Signal/Hintergrund-Verhältnis beträgt zurzeit lediglich 2,5/1 und sollte verbessert werden. Hierzu sollte ebenfalls eine Titration mit Natriumchlorid vorgenommen werden.

Aus den Daten des kompetitiven Assays wurde eine Inhibierung des Signals erhalten; es kann aber noch keine Aussage über die Spezifität gemacht werden. Das ungetaggte Protein zeigte dieselben Wechselwirkungsmechanismen wie das getaggte Protein. Um die Spezifität des Assays zu überprüfen, wäre eine Mutante herzustellen, die keine Bindung zu eIF4A eingehen kann. Hierzu könnte die Struktur von Komplex eIF4MD:eIF4A von *S. cerevisiae* als Vorlage für die Mutanten genommen werden. Von Imataka und Sonenberg (1997) [36] und Morion et al. (2000)[29] wurde etwa die Bindungsoberfläche von eIF4GMD bei der Sequenz (767-778) ILNKLTPXXF untersucht, wobei die Mutante IANKATPXXA hergestellt wurde, die keine Bindung zu eIF4A zeigt.

7 Literaturverzeichnis

1. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: **Biochemie**, 6 edn: Springer Spektrum; 2007.
2. Tange TØ, Nott A, Moore MJ: **The ever-increasing complexities of the exon junction complex**. *Current Opinion in Cell Biology* 2004, **16**(3):279-284.
3. Fischer PM: **Cap in hand: Targeting eIF4E**. *Cell Cycle* 2009, **8**(16):2535-2541.
4. Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ: **The highways and byways of mRNA decay**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, **8**(2):113-126.
5. Richter JD: **Cytoplasmic Polyadenylation in Development and Beyond**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1999, **63**(2):446-456.
6. Cole CN, Scarcelli JJ: **Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm**. *Current Opinion in Cell Biology* 2006, **18**(3):299-306.
7. Jackson RJ, Hellen CUT, Pestova TV: **The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010, **11**(2):113-127.
8. Jia Y, Polunovsky V, Bitterman PB, Wagner CR: **Cap-Dependent Translation Initiation Factor eIF4E: An Emerging Anticancer Drug Target**. *Medicinal Research Reviews* 2012, **32**(4):786-814.
9. Wilson JE, Pestova TV, Hellen CUT, Sarnow P: **Initiation of Protein Synthesis from the A Site of the Ribosome**. *Cell* 2000, **102**(4):511-520.
10. Silvera D, Formenti SC, Schneider RJ: **Translational control in cancer**. *Nat Rev Cancer* 2010, **10**(4):254-266.
11. Lomakin IB, Kolupaeva VG, Marintchev A, Wagner G, Pestova TV: **Position of eukaryotic initiation factor eIF1 on the 40S ribosomal subunit determined by directed hydroxyl radical probing**. *Genes & Development* 2003, **17**(22):2786-2797.

12. Pestova TV, Kolupaeva VG: **The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection.** *Genes & Development* 2002, **16**(22):2906-2922.
13. Merrick WC: **Initiation of protein biosynthesis in eukaryotes.** *Biochemistry and Molecular Biology Education* 2003, **31**(6):378-385.
14. Gingras A-C, Raught B, Sonenberg N: **eIF4 INITIATION FACTORS: Effectors of mRNA Recruitment to Ribosomes and Regulators of Translation.** *Annual Review of Biochemistry* 1999, **68**(1):913-963.
15. Byrd AK, Raney KD: **Superfamily 2 helicases.** *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 2012, **17**:2070-2088.
16. Story RM, Steitz TA: **Structure of the recA protein-ADP complex.** *Nature* 1992, **355**(6358):374-376.
17. Linder P, Lasko PF, Ashburner M, Leroy P, Nielsen PJ, Nishi K, Schnier J, Slonimski PP: **Birth of the D-E-A-D box.** *Nature* 1989, **337**(6203):121-122.
18. Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ: **Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold.** *The EMBO Journal* 1982, **1**(8):945-951.
19. Hall MC, Matson SW: **Helicase motifs: the engine that powers DNA unwinding.** *Molecular Microbiology* 1999, **34**(5):867-877.
20. Tanner NK, Linder P: **DExD/H Box RNA Helicases: From Generic Motors to Specific Dissociation Functions.** *Molecular Cell* 2001, **8**(2):251-262.
21. Pause A, Méthot N, Sonenberg N: **The HRIGRXXR region of the DEAD box RNA helicase eukaryotic translation initiation factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis.** *Molecular and Cellular Biology* 1993, **13**(11):6789-6798.

22. Ferraiuolo MA, Lee C-S, Ler LW, Hsu JL, Costa-Mattioli M, Luo M-J, Reed R, Sonenberg N: **A nuclear translation-like factor eIF4AIII is recruited to the mRNA during splicing and functions in nonsense-mediated decay.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, **101**(12):4118-4123.
23. Bono F, Ebert J, Lorentzen E, Conti E: **The Crystal Structure of the Exon Junction Complex Reveals How It Maintains a Stable Grip on mRNA.** *Cell*, **126**(4):713-725.
24. Andersen CBF, Ballut L, Johansen JS, Chamieh H, Nielsen KH, Oliveira CLP, Pedersen JS, Séraphin B, Hir HL, Andersen GR: **Structure of the Exon Junction Core Complex with a Trapped DEAD-Box ATPase Bound to RNA.** *Science* 2006, **313**(5795):1968-1972.
25. Cordin O, Banroques J, Tanner NK, Linder P: **The DEAD-box protein family of RNA helicases.** *Gene* 2006, **367**(0):17-37.
26. Benz J, Trachsel H, Baumann U: **Crystal structure of the ATPase domain of translation initiation factor 4A from *Saccharomyces cerevisiae* – the prototype of the DEAD box protein family.** *Structure* 1999, **7**(6):671-679.
27. Caruthers JM, Johnson ER, McKay DB: **Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2000, **97**(24):13080-13085.
28. Lorsch JR, Herschlag D: **The DEAD Box Protein eIF4A. 1. A Minimal Kinetic and Thermodynamic Framework Reveals Coupled Binding of RNA and Nucleotide.** *Biochemistry* 1998, **37**(8):2180-2193.
29. Morino S, Imataka H, Svitkin YV, Pestova TV, Sonenberg N: **Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (eIF4E) Binding Site and the Middle One-Third of eIF4GI Constitute the Core Domain for Cap-Dependent Translation, and the C-Terminal One-Third Functions as a Modulatory Region.** *Molecular and Cellular Biology* 2000, **20**(2):468-477.

30. Fujita Y, Oe M, Tutsumino T, Morino S, Imataka H, Tomoo K, Ishida T: **Domain-dependent Interaction of Eukaryotic Initiation Factor eIF4A for Binding to Middle and C-terminal Domains of eIF4G.** *Journal of Biochemistry* 2009, **146**(3):359-368.
31. Marintchev A, Edmonds KA, Marintcheva B, Hendrickson E, Oberer M, Suzuki C, Herdy B, Sonenberg N, Wagner G: **Topology and Regulation of the Human eIF4A/4G/4H Helicase Complex in Translation Initiation.** *Cell* 2009, **136**(3):447-460.
32. Nielsen KH, Behrens MA, He Y, Oliveira CLP, Sottrup Jensen L, Hoffmann SV, Pedersen JS, Andersen GR: **Synergistic activation of eIF4A by eIF4B and eIF4G.** *Nucleic Acids Research* 2011, **39**(7):2678-2689.
33. Imataka H, Sonenberg N: **Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A.** *Molecular and Cellular Biology* 1997, **17**(12):6940-6947.
34. Groves MR, Hanlon N, Turowski P, Hemmings BA, Barford D: **The Structure of the Protein Phosphatase 2A PR65/A Subunit Reveals the Conformation of Its 15 Tandemly Repeated HEAT Motifs.** *Cell* 1999, **96**(1):99-110.
35. De Gregorio E, Preiss T, Hentze MW: **Translation driven by an eIF4G core domain in vivo.** *The EMBO Journal* 1999, **18**(17):4865-4874.
36. Imataka H, Olsen HS, Sonenberg N: **A new translational regulator with homology to eukaryotic translation initiation factor 4G.** *The EMBO Journal* 1997, **16**(4):817-825.
37. Schütz P, Bumann M, Oberholzer AE, Bieniossek C, Trachsel H, Altmann M, Baumann U: **Crystal structure of the yeast eIF4A-eIF4G complex: An RNA-helicase controlled by protein–protein interactions.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2008, **105**(28):9564-9569.
38. Bellsollell L, Cho-Park PF, Poulin F, Sonenberg N, Burley SK: **Two Structurally Atypical HEAT Domains in the C-Terminal Portion of Human eIF4G Support Binding to eIF4A and Mnk1.** *Structure* 2006, **14**(5):913-923.

39. Mamane Y, Petroulakis E, LeBacquer O, Sonenberg N: **mTOR, translation initiation and cancer.** *Oncogene* 2006, **25**(48):6416-6422.
40. Lankat-Buttgereit B, Göke R: **The tumour suppressor Pdc4: recent advances in the elucidation of function and regulation.** *Biology of the Cell* 2009, **101**(6):309-317.
41. Sonenberg N, Pause A: **Protein Synthesis and Oncogenesis Meet Again.** *Science* 2006, **314**(5798):428-429.
42. Yang H-S, Jansen AP, Komar AA, Zheng X, Merrick WC, Costes S, Lockett SJ, Sonenberg N, Colburn NH: **The Transformation Suppressor Pdc4 Is a Novel Eukaryotic Translation Initiation Factor 4A Binding Protein That Inhibits Translation.** *Molecular and Cellular Biology* 2003, **23**(1):26-37.
43. Chang JH, Cho YH, Sohn SY, Choi JM, Kim A, Kim YC, Jang SK, Cho Y: **Crystal structure of the eIF4A–PDCD4 complex.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009, **106**(9):3148-3153.
44. Zakowicz H, Yang H-S, Stark C, Wlodawer A, Laronde-Leblanc N, Colburn NH: **Mutational analysis of the DEAD-box RNA helicase eIF4AII characterizes its interaction with transformation suppressor Pdc4 and eIF4GI.** *RNA* 2005, **11**(3):261-274.
45. Shahbazian D, Parsyan A, Petroulakis E, Hershey J, Sonenberg N: **eIF4B controls survival and proliferation and is regulated by proto-oncogenic signaling pathways.** *Cell Cycle* 2010, **9**(20):4106-4109.
46. Harms U, Andreou AZ, Gubaev A, Klostermeier D: **eIF4B, eIF4G and RNA regulate eIF4A activity in translation initiation by modulating the eIF4A conformational cycle.** *Nucleic Acids Research* 2014, **42**(12):7911-7922.
47. Blagden SP, Willis AE: **The biological and therapeutic relevance of mRNA translation in cancer.** *Nat Rev Clin Oncol* 2011, **8**(5):280-291.
48. Konicek BW, Dumstorf CA, Graff JR: **Targeting the eIF4F translation initiation complex for cancer therapy.** *Cell Cycle* 2008, **7**(16):2466-2471.

49. Graff JR, Konicek BW, Carter JH, Marcusson EG: **Targeting the Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E for Cancer Therapy.** *Cancer Research* 2008, **68**(3):631-634.
50. Willimott S, Beck D, Ahearne MJ, Adams VC, Wagner SD: **Cap-Translation Inhibitor, 4EGI-1, Restores Sensitivity to ABT-737 Apoptosis through Cap-Dependent and -Independent Mechanisms in Chronic Lymphocytic Leukemia.** *Clinical Cancer Research* 2013, **19**(12):3212-3223.
51. Chen L, Aktas BH, Wang Y, He X, Sahoo R, Zhang N, Denoyelle S, Kabha E, Yang H, Freedman RY *et al*: **Tumor suppression by small molecule inhibitors of translation initiation.** *Oncotarget* 2012, **3**(8):869-881.
52. Emond A, Del Rincon SV, Huor B, Pettersson F, Miller WH: **Abstract A154: Inhibition of eIF4E with Ribavirin suppresses EMT and breast cancer invasiveness.** *Molecular Cancer Therapeutics* 2013, **12**(11 Supplement):A154-A154.
53. Shuda M, Kondoh N, Tanaka K, Ryo A, Wakatsuki T, Hada A, Goseki N, Igari T, Hatsuse K, Aihara T *et al*: **Enhanced expression of translation factor mRNAs in hepatocellular carcinoma.** *Anticancer Res* 2000, **20**(4):2489-2494.
54. Eberle J, Krasagakis K, Orfanos CE: **Translation initiation factor eIF-4A1 mRNA is consistently overexpressed in human melanoma cells in vitro.** *International journal of cancer Journal international du cancer* 1997, **71**(3):396-401.
55. Shadrick WR, Ndjomou J, Kolli R, Mukherjee S, Hanson AM, Frick DN: **Discovering New Medicines Targeting Helicases: Challenges and Recent Progress.** *Journal of Biomolecular Screening* 2013, **18**(7):761-781.
56. Low W-K, Li J, Zhu M, Kommaraju SS, Shah-Mittal J, Hull K, Liu JO, Romo D: **Second-generation derivatives of the eukaryotic translation initiation inhibitor pateamine A targeting eIF4A as potential anticancer agents.** *Bioorganic & medicinal chemistry* 2014, **22**(1):116-125.

57. Tsumuraya T, Ishikawa C, Machijima Y, Nakachi S, Senba M, Tanaka J, Mori N: **Effects of hippuristanol, an inhibitor of eIF4A, on adult T-cell leukemia.** *Biochemical Pharmacology* 2011, **81**(6):713-722.
58. Kim S, Hwang BY, Su B-N, Chai H, Mi Q, Kinghorn AD, Wild R, Swanson SM: **Silvestrol, a Potential Anticancer Rocaglate Derivative from Aglaia foveolata, Induces Apoptosis in LNCaP Cells through the Mitochondrial/Apoptosome Pathway without Activation of Executioner Caspase-3 or -7.** *Anticancer research* 2007, **27**(4B):2175-2183.
59. Wolfe AL, Singh K, Zhong Y, Drewe P, Rajasekhar VK, Sanghvi VR, Mavrakis KJ, Jiang M, Roderick JE, Van der Meulen J *et al*: **RNA G-quadruplexes cause eIF4A-dependent oncogene translation in cancer.** *Nature* 2014, **513**(7516):65-70.
60. Kim WJ, Kim JH, Jang SK: **Anti - inflammatory lipid mediator 15d - PGJ2 inhibits translation through inactivation of eIF4A.** *The EMBO Journal* 2007, **26**(24):5020-5032.
61. Bordeleau M-E, Cencic R, Lindqvist L, Oberer M, Northcote P, Wagner G, Pelletier J: **RNA-Mediated Sequestration of the RNA Helicase eIF4A by Pateamine A Inhibits Translation Initiation.** *Chemistry & Biology* 2006, **13**(12):1287-1295.
62. Bordeleau M-E, Matthews J, Wojnar JM, Lindqvist L, Novac O, Jankowsky E, Sonenberg N, Northcote P, Teesdale-Spittle P, Pelletier J: **Stimulation of mammalian translation initiation factor eIF4A activity by a small molecule inhibitor of eukaryotic translation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, **102**(30):10460-10465.
63. Bordeleau M-E, Mori A, Oberer M, Lindqvist L, Chard LS, Higa T, Belsham GJ, Wagner G, Tanaka J, Pelletier J: **Functional characterization of IRESes by an inhibitor of the RNA helicase eIF4A.** *Nat Chem Biol* 2006, **2**(4):213-220.
64. Bordeleau M-E, Robert F, Gerard B, Lindqvist L, Chen SMH, Wendel H-G, Brem B, Greger H, Lowe SW, Porco JA *et al*: **Therapeutic suppression of translation initiation**

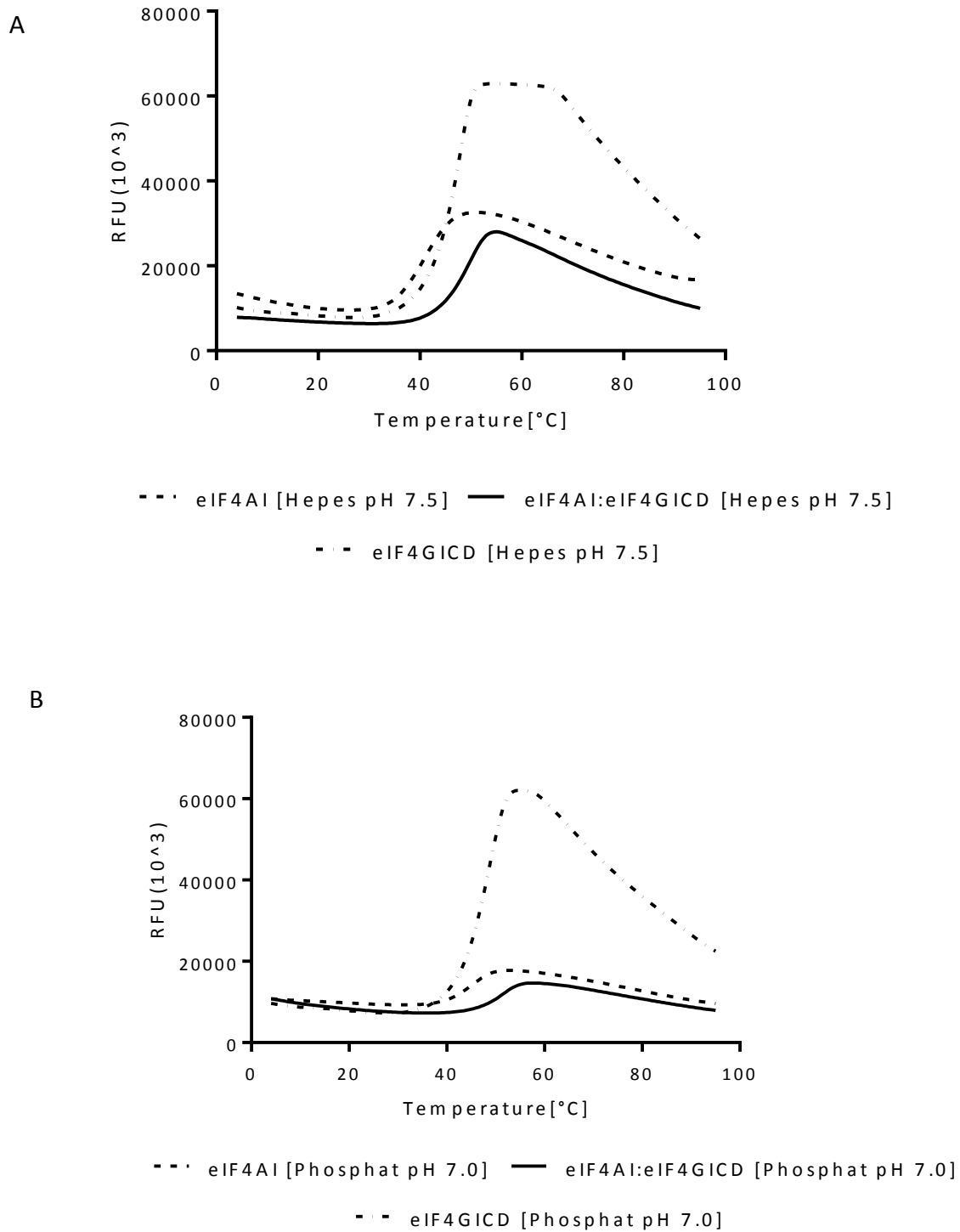
- modulates chemosensitivity in a mouse lymphoma model.** *The Journal of Clinical Investigation* 2008, **118**(7):2651-2660.
65. Cencic R, Carrier M, Galicia-Vázquez G, Bordeleau M-E, Sukarieh R, Bourdeau A, Brem B, Teodoro JG, Greger H, Tremblay ML *et al*: **Antitumor Activity and Mechanism of Action of the Cyclopenta[b]benzofuran, Silvestrol.** *PLoS ONE* 2009, **4**(4):e5223.
 66. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, Philpott KL: **Principles of early drug discovery.** *British Journal of Pharmacology* 2011, **162**(6):1239-1249.
 67. Roses AD: **Pharmacogenetics and drug development: the path to safer and more effective drugs.** *Nat Rev Genet* 2004, **5**(9):645-656.
 68. Bleicher KH, Bohm H-J, Muller K, Alanine AI: **Hit and lead generation: beyond high-throughput screening.** *Nat Rev Drug Discov* 2003, **2**(5):369-378.
 69. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ: **Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings.** *Advanced Drug Delivery Reviews* 1997, **23**(1–3):3-25.
 70. Palm K, Stenberg P, Luthman K, Artursson P: **Polar Molecular Surface Properties Predict the Intestinal Absorption of Drugs in Humans.** *Pharm Res* 1997, **14**(5):568-571.
 71. Zhang J-H, Chung TDY, Oldenburg KR: **A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays.** *Journal of Biomolecular Screening* 1999, **4**(2):67-73.
 72. Brideau C, Gunter B, Pikounis B, Liaw A: **Improved Statistical Methods for Hit Selection in High-Throughput Screening.** *Journal of Biomolecular Screening* 2003, **8**(6):634-647.
 73. Arkin MR, Glicksman MA, Fu H, Havel JJ, Du Y: **Inhibition of Protein-Protein Interactions: Non-Cellular Assay Formats.** In: *Assay Guidance Manual*. edn. Edited by Sittampalam GS, Gal-Edd N, Arkin M, Auld D, Austin C, Bejcek B, Glicksman M, Inglese

- J, Lemmon V, Li Z *et al.* Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences
- Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.; 2004.
74. Förster T: **Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz.** *Annalen der Physik* 1948, **437**(1-2):55-75.
75. Mathis G: **Probing molecular interactions with homogeneous techniques based on rare earth cryptates and fluorescence energy transfer.** *Clinical Chemistry* 1995, **41**(9):1391-1397.
76. Diamandis EP: **Immunoassays with time-resolved fluorescence spectroscopy: Principles and applications.** *Clinical Biochemistry* 1988, **21**(2):139-150.
77. Schrödel A: **Der High-Dose-Hook-Effekt.** *Biologie in unserer Zeit* 2011, **41**(4):231-231.
78. Studier FW: **Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures.** *Protein Expression and Purification* 2005, **41**(1):207-234.
79. Webb MR: **A continuous spectrophotometric assay for inorganic phosphate and for measuring phosphate release kinetics in biological systems.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, **89**(11):4884-4887.
80. Goldschmidt L, Cooper DR, Derewenda ZS, Eisenberg D: **Toward rational protein crystallization: A Web server for the design of crystallizable protein variants.** *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 2007, **16**(8):1569-1576.
81. Pickett SD, Sternberg MJE: **Empirical Scale of Side-Chain Conformational Entropy in Protein Folding.** *Journal of Molecular Biology* 1993, **231**(3):825-839.
82. Rich RL, Myszkowski DG: **Higher-throughput, label-free, real-time molecular interaction analysis.** *Analytical Biochemistry* 2007, **361**(1):1-6.
83. Hazes B, Dijkstra BW: **Model Building of Disulfide Bonds In Proteins With Known Three-Dimensional Structure.** *PROTEIN ENGINEERING* 1988, **2**:119-125.

84. Singh R, Lamoureux GV, Lees WJ, Whitesides GM: **Reagents for rapid reduction of disulfide bonds**. In: *Methods in Enzymology. Volume Volume 251*, edn. Edited by Lester P: Academic Press; 1995: 167-173.
85. Linder P, Jankowsky E: **From unwinding to clamping — the DEAD box RNA helicase family**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2011, **12**(8):505-516.
86. Benicchi T, Iozzi S, Svahn A, Axelsson H, Mori E, Bernocco S, Cappelli F, Caramelli C, Fanti P, Genesio E *et al*: **A Homogeneous HTRF Assay for the Identification of Inhibitors of the TWEAK-Fn14 Protein Interaction**. *Journal of Biomolecular Screening* 2012, **17**(7):933-945.
87. Ingolia NT: **Ribosome profiling: new views of translation, from single codons to genome scale**. *Nat Rev Genet* 2014, **15**(3):205-213.

8 Anhang

8.1 Differential Scanning Fluorimetry von eIF4A:eIF4GICD(1572)



C

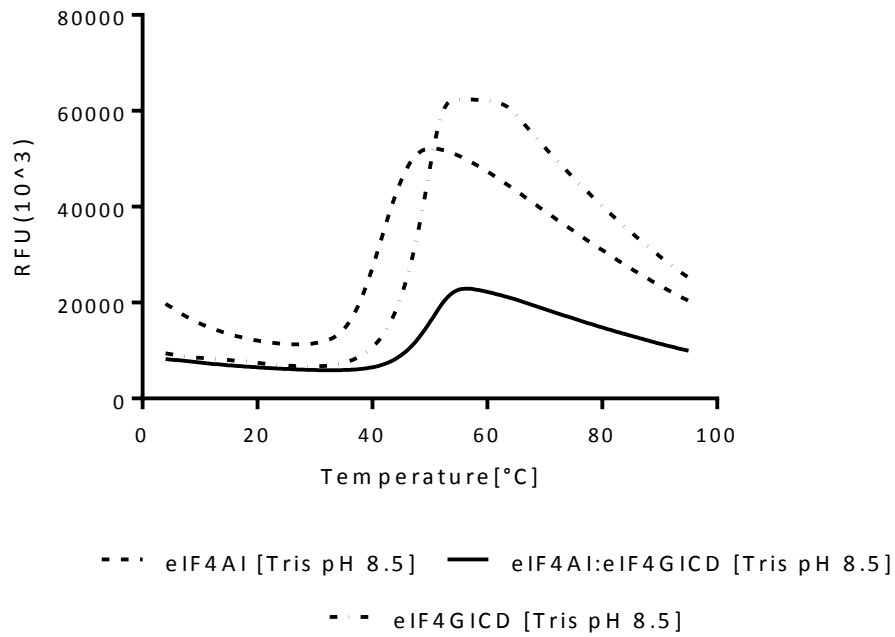
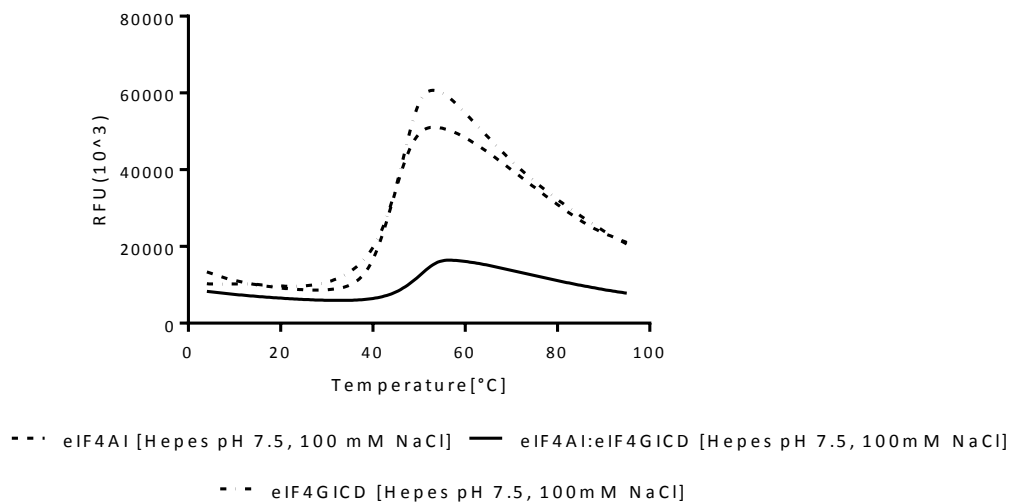


Abbildung 8.1: Darstellung der Schmelzkurven von eIF4A:eIF4GICD(1572). Die Relative Fluoreszenz-Einheit (RFU 10³) ist gegen die Temperatur aufgetragen. Puffersysteme: A: Hepes pH 7,5; B: Phosphat pH 7,0 C: Tris pH 8.5.

A



B

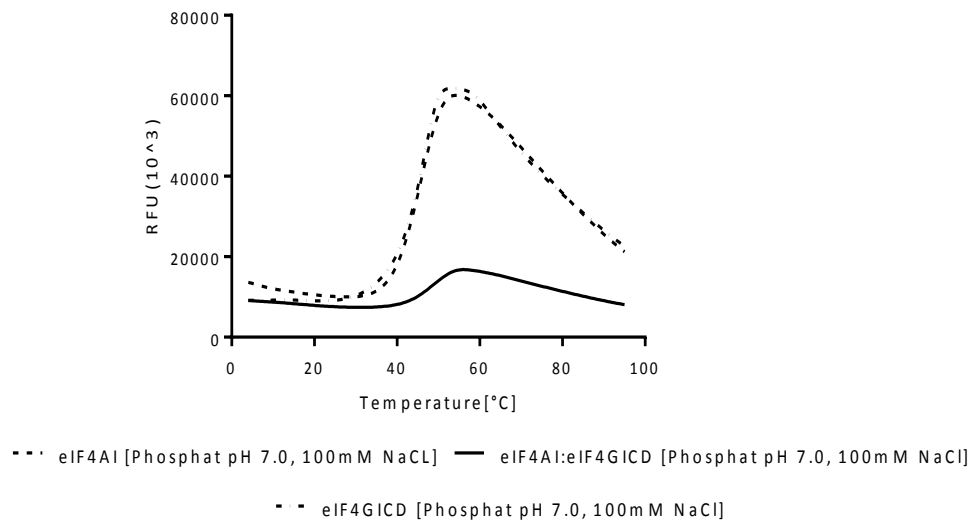
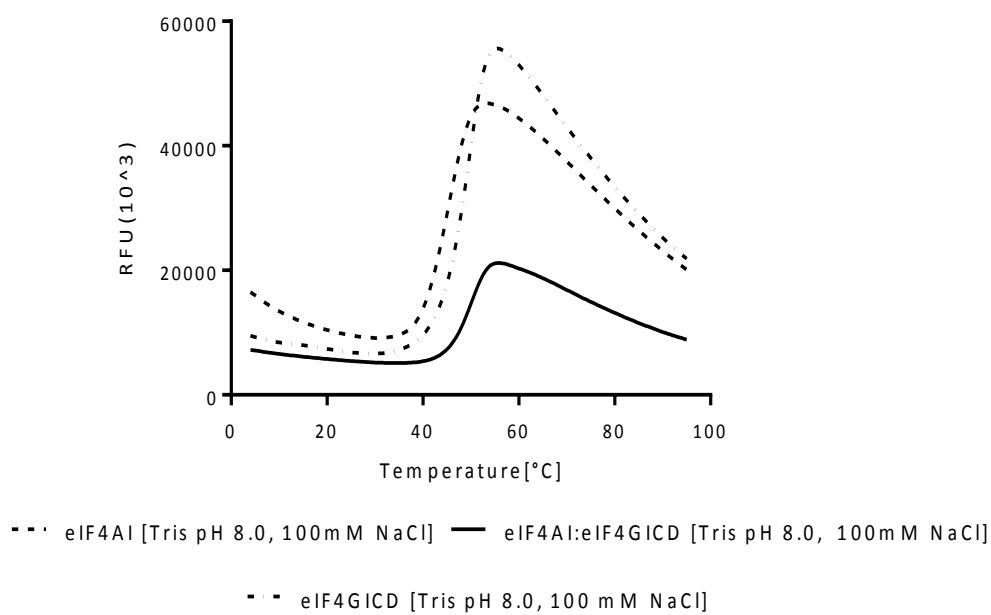


Abbildung 8.2: Darstellung der Schmelzkurven von eIF4A:eIF4G1CD(1572). Die Relative Fluoreszenz-Einheit (RFU 10³) ist gegen die Temperatur aufgetragen. Puffersysteme: A: Hepes pH 7,5 100 mM NaCl; B: Phosphat pH 7,0, 100 mM NaCl.

C



D

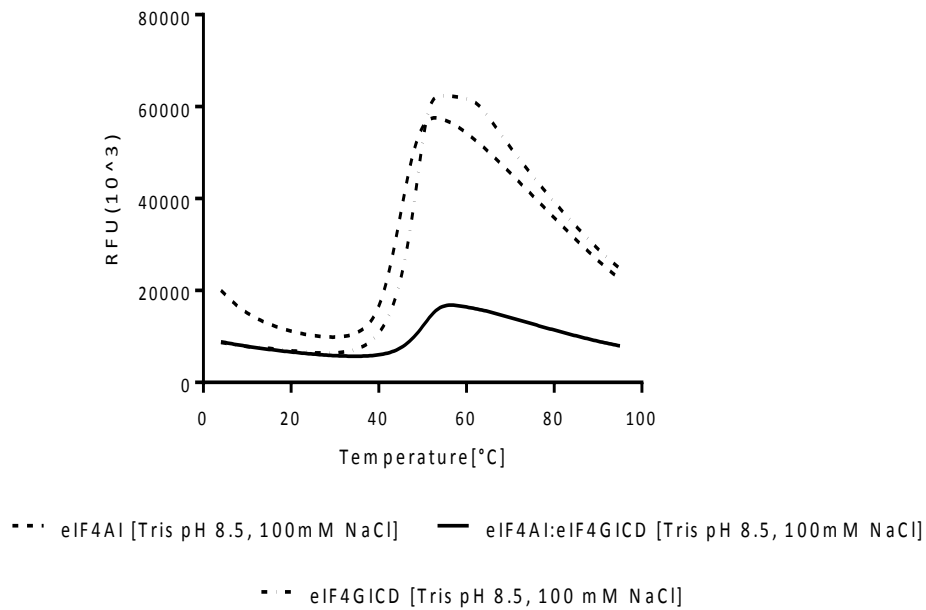


Abbildung 8.3: Darstellung der Schmelzkurven von eIF4A:eIF4GICD(1572). Die Relative Fluoreszenz-Einheit (RFU 10^3) ist gegen die Temperatur aufgetragen. Puffersysteme: C: Tris pH 8.0, 100 mM NaCl; D: Tris pH 8.5, 100 mM NaCl.

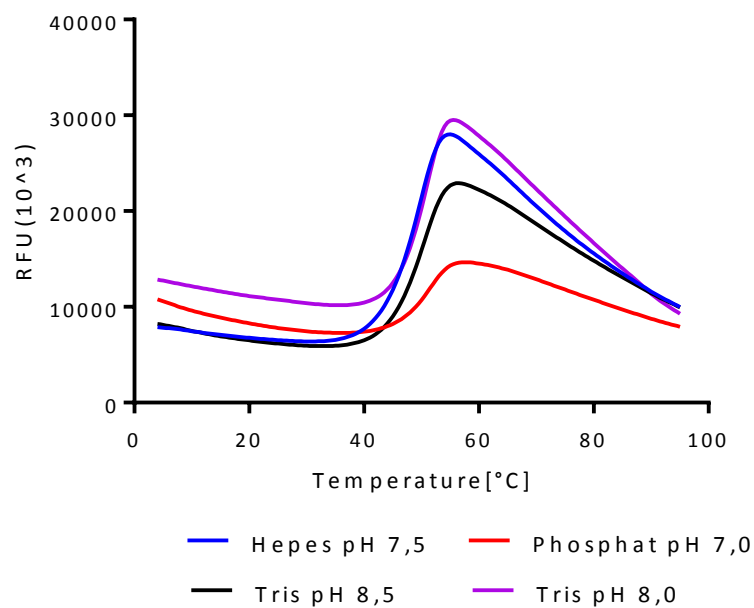


Abbildung 8.4: Darstellung der Schmelzkurven von eIF4A:eIF4GICD(1572) mit AMP-PNP und Hefe RNA. Die Relative Fluoreszenz-Einheit (RFU 10^3) ist gegen die Temperatur aufgetragen. Puffersysteme: Phosphat pH 7,0; Hepes pH 7,5; Tris pH 8,0; Tris pH 8,5.

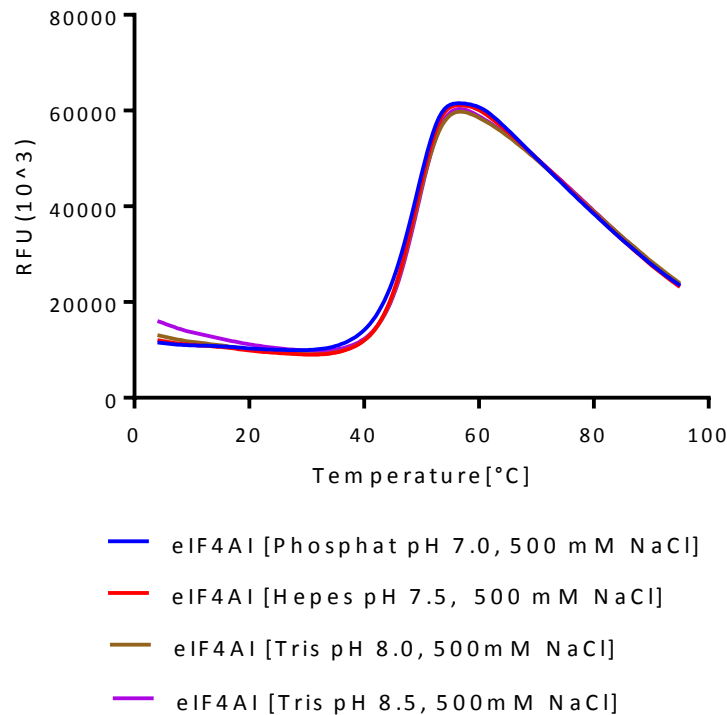


Abbildung 8.5: Darstellung der Schmelzkurven von eIF4A. Die Relative Fluoreszenz-Einheit (RFU 10^3) ist gegen die Temperatur aufgetragen. Puffersysteme: Phosphat pH 7,0, 500 mM NaCl; Hepes pH 7,5, 500 mM NaCl; Tris pH 8,0, 500 mM NaCl; Tris pH 8,5, 500 mM NaCl.

8.2 Oberflächenentropie-Reduktionsmutanten von eIF4GICD

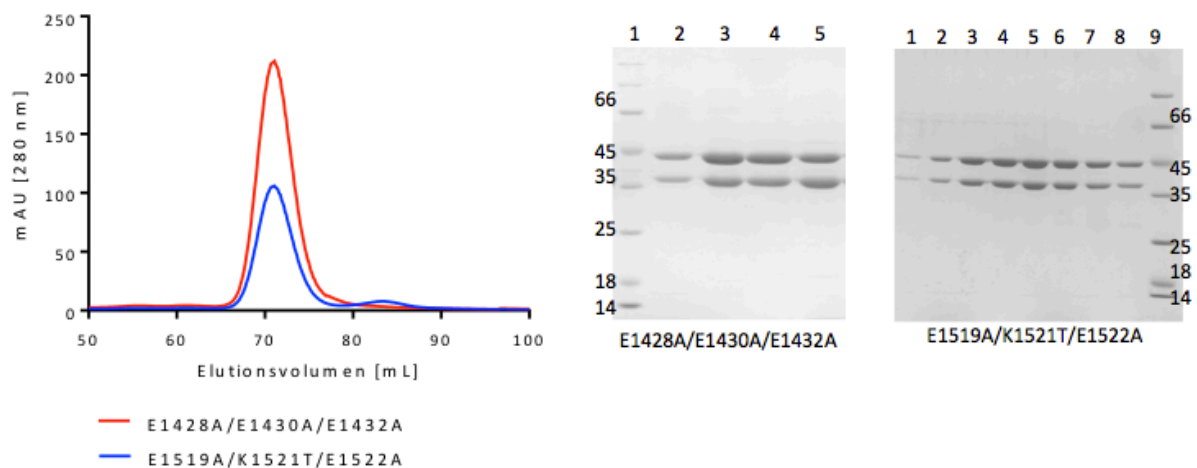


Abbildung 8.6: Darstellung des Elutionsprofils und SDS Gel-Analyse von E1428A/E1430A/E1432A und E1519A/K1521T/E1522A, das Elutionsvolumen beträgt 73 ml, 12 % SDS Gel: Spur 1 und Spur 9: Unstain Protein Marker; Spur 1-8: Fraktionen des Elutionsvolumens.

8.3 HTR-FRET-Assay eIF4A:eIF4GICD(1426)

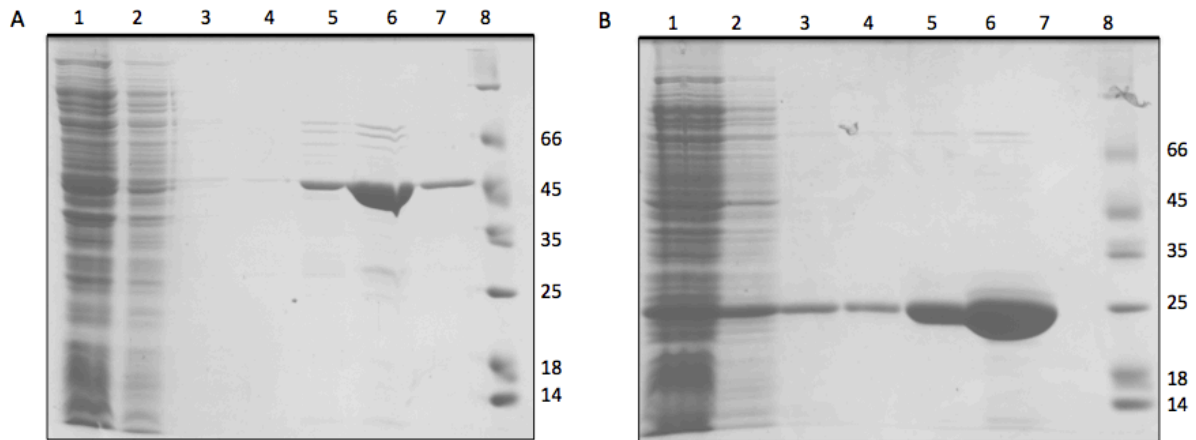


Abbildung 8.7: SDS Gel-Analyse der Aufreinigung des Ni-Chelat-Affinitäts-Chromatographie. A: 12 % SDS Page : Spur 1: Rohlysate, Spur 2: Durchlauf, Spur 3: Waschpuffer (10 mM Imidazol) Spur 4: Waschpuffer II (10 mM Imidazol); Spur 5: Waschpuffer III (30 mM Imidazol), Spur 6: Elution I, Spur 7 : Elution 2. Spur 8 Unstain Protein Marker Fermentas B: Spur 1: Rohlysate, Spur 2: Durchlauf, Spur 3: Waschpuffer (10 mM Imidazol) Spur 4: Waschpuffer II (10 mM Imidazol); Spur 5: Waschpuffer III (30 mM Imidazol), Spur 6: Elution I, Spur 7 : Elution 2. Spur 8 Unstain Protein Marker

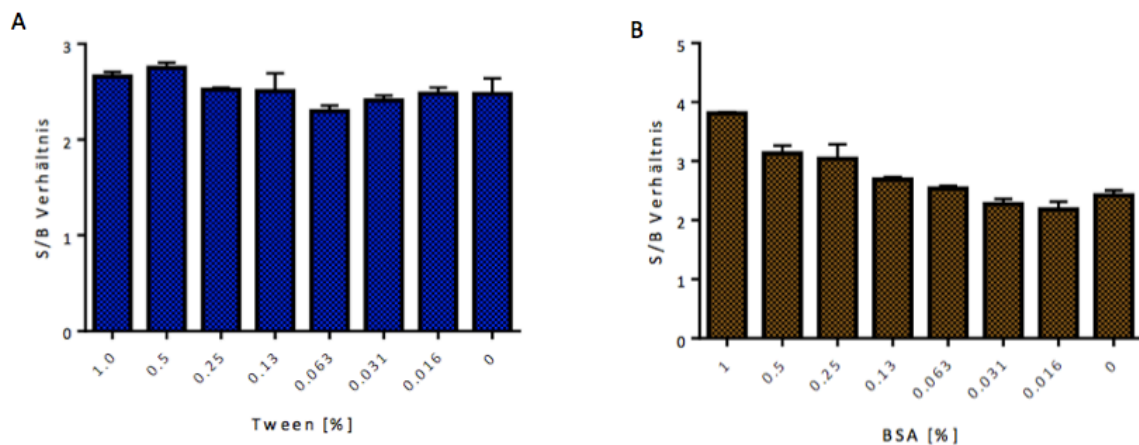


Abbildung 8.8: Darstellung der Titration-Daten von eIF4A-Myc/eIF4GICD-His mit den Antikörpern Tb-His und XL665-Myc im Puffer: 50 mM Hepes pH 7.5. A: Signal/Hintergrund-Verhältnis gegen die finale Tween [v/v %]. B: Signal/Hintergrund-Verhältnis gegen die finale BSA [v/w %].

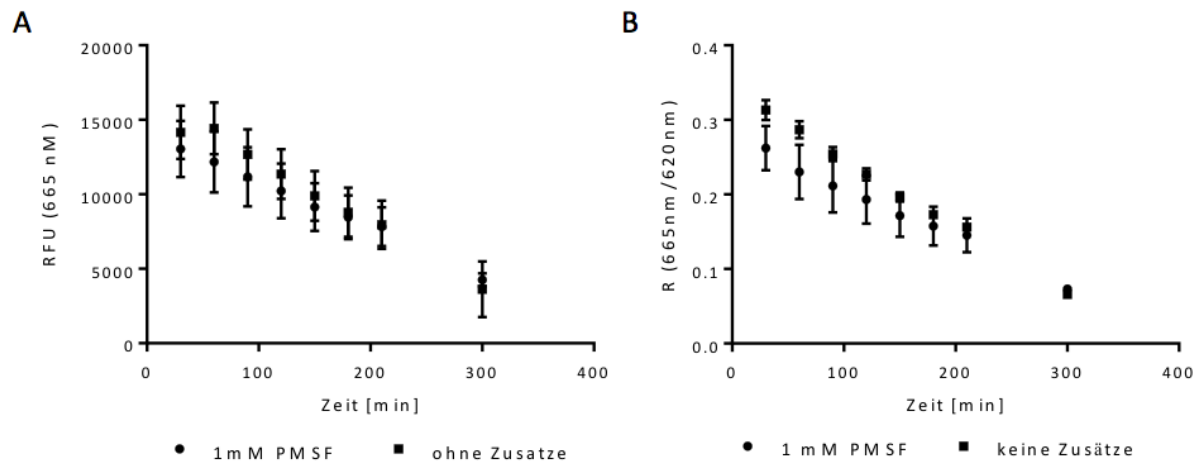


Abbildung 8.9: Darstellung der Signalstabilität des HTR-FRETs von eIF4A-Myc:eIF4GICD-His. A: Signalabnahme des HTR-FRET-Verhältnisses (R) gegen die Zeit ohne Zugabe/ mit 1 mM PMSF. B: Abnahme der relative Fluoreszenz Unit (RFU) von XL665 gegen die Zeit ohne Zugabe/ mit 1 mM PMSF.

8.4 Aminosäuresequenz der Konstrukte

eIF4AI (21-406)

```

      10          20          30          40          50          60
MGSSHHHHHHH SSSLVPRGSH MGVIESNWN EIVDSFDDMNL SESLLRGIYA YGFEKPSAIQ

      70          80          90          100         110         120
QRAILPCIKG YDVIAQAQSG TGKTATFAIS ILQQIELDLK ATQALVLAPT RELAQQIQKV

      130         140         150         160         170         180
VMALGDYMG A SCHACIGGTN VRAEVQKLQM EAPHIIVGTP GRVFDMLNRR YLSPKYIKMF

      190         200         210         220         230         240
VLDEADEMLS RGFKDQIYDI FQKLNSNTQV VLLSATMPSD VLEVTKKFMR DPIRILVKKE

      250         260         270         280         290         300
ELTLEGIRQF YINVEREEWK LDTLCDLYET LTITQAVIFI NTRRKVDWLT EKM HARDF TV

      310         320         330         340         350         360
SAMHGDM DQK ERDVIMREFR SGSSRVLITT DLLARGIDVQ QVSLVINYDL PTNRENYIHR

      370         380         390         400
IGRGGRFGRK GVAINMVTEE DKRTL RDIET FYNTSIEEMP LNVADLI

```

TAG	AS	M _w [kDa]	pI	Abs 0.1 % (= 1 g/l)	Extinktions- koeffizient
+	407	46.3	6.20	0.743	34380
-	390	44.4	5.60	0.774	34380

eIF4AI-Myc (21-406)

```

      10          20          30          40          50          60
MGSSHHHHHHH SSSLVPRGSH MGVIESNWN EIVDSFDDMNL SESLLRGIYA YGFEKPSAIQ

      70          80          90          100         110         120
QRAILPCIKG YDVIAQAQSG TGKTATFAIS ILQQIELDLK ATQALVLAPT RELAQQIQKV

      130         140         150         160         170         180
VMALGDYMG A SCHACIGGTN VRAEVQKLQM EAPHIIVGTP GRVFDMLNRR YLSPKYIKMF

      190         200         210         220         230         240
VLDEADEMLS RGFKDQIYDI FQKLNSNTQV VLLSATMPSD VLEVTKKFMR DPIRILVKKE

      250         260         270         280         290         300
ELTLEGIRQF YINVEREEWK LDTLCDLYET LTITQAVIFI NTRRKVDWLT EKM HARDF TV

      310         320         330         340         350         360
SAMHGDM DQK ERDVIMREFR SGSSRVLITT DLLARGIDVQ QVSLVINYDL PTNRENYIHR

      370         380         390         400         410
IGRGGRFGRK GVAINMVTEE DKRTL RDIET FYNTSIEEMP LNVADLIGEQ KLISEEDL

```

TAG	AS	M _w [kDa]	pI	Abs 0.1 % (= 1 g/l)	Extinktions- koeffizient
+	418	47.5	5.89	0.723	34380
-	401	45.6	5.39	0.753	34380

eIF4AI(G70C/R367C)

10 20 30 40 50 60
 MGSSHHHHHH SSSLVPRGSH MGVIESNWE IVDSFDDMNL SESLLRGIYA YGFEKPSAIQ
 70 80 90 100 110 120
 QRAILPIIKG YDVIAQAQSC TGKTATFAIS ILQQIELDLK ATQALVLAPT RELAQQIQKV
 130 140 150 160 170 180
 VMALGDYMG A SVHAAIGGTN VRAEVQKLQM EAPHIIVGTP GRVFDMLNRR YLSPKYIKMF
 190 200 210 220 230 240
 VLDEADEMLS RGFKDQIYDI FQKLNSNTQV VLLSATMPSD VLEVTKXFM R DPIRILVKKE
 250 260 270 280 290 300
 ELTLEGIRQF YINVEREEWK LDTLTDLYET LTITQAVIFI NTRRKVDWLT EKM HARDFTV
 310 320 330 340 350 360
 SAMHGDM DQK ERDVIMREFR SGSSRVLITT DLLARGIDVQ QVSLVINYDL PTNRENYIHR
 370 380 390 400
 IGRGGCFGRK GVAINMVTEE DKRTL RDIET FYNTSIEEMP LNVADLI

TAG	AS	M _w [kDa]	pI	Abs 0.1 % (= 1 g/l)	Extinktions- koeffizient
+	407	46.2	5.89	0.743	34380
-	390	44.3	5.46	0.775	34380

eIF4GICD (1234-1572)

10 20 30 40 50 60
 MGSSHHHHHH SSSLVPRGSH MASLKAALSE EELEKKS KAI IEEYLHLNDM KEAVQCVQEL
 70 80 90 100 110 120
 ASPSLLFIFV RHGVESTLER SAIAREHMGQ LLHQLLCAGH LSTAQYYQGL YEILELAEDM
 130 140 150 160 170 180
 EIDIPHVWLY LAELVTPILQ EGGVPMGELF REITKPLRPL GKAASLLEI LGLLCKSMGP
 190 200 210 220 230 240
 KKVGT LWREA GLSWKEFLPE GQDIGAFVAE QKVEYTLGEE SEAPGQRALP SEELNRQLEK
 250 260 270 280 290 300
 LLKEGSSNQR VFDWIEANLS EQQIVSNTLV RALMTAVCYS AIIFETPLRV DVAVLKARAK
 310 320 330 340 350 360
 LLQKYL CDEQ KELQALYALQ ALVVTTLEQPP NLLRMFFDAL YDEDVVKEDA FYSWESSKDP

AEQ

TAG	AS	M _w [kDa]	pI	Abs 0.1 % (= 1 g/l)	Extinktions- koeffizient
+	363	40.8	5.11	1.074	43890
-	348	40	4.82	1.126	43890

eIF4GICD-His (1234-1421)

10 20 30 40 50 60
 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MASLKAALSE EELEKKS KAI IEEYLHLNDM KEAVQCVQEL
 70 80 90 100 110 120
 ASPSLLFIFV RHGVESTLER SAIAREHMGQ LLHQLLCAGH LSTAQYYQGL YEILELAEDM
 130 140 150 160 170 180
 EIDIPHVWLY LAELVTPILQ EGGVPMGELF REITKPLRPL GKAASLLLEI LGLLCKSMGP
 190 200 210 220
 KKVGTWREA GLSWKEFLPE GQDIGAFVAE QKVEYTLLEH HHHHH

TAG	AS	M _w [kDa]	pI	Abs 0.1 % (= 1 g/l)	Extinktions- koeffizient
+	225	25.3	5.92	1.01	25440
-	208	23.4	5.50	1.08	25440

eIF4GICD-**HA** (1234-1421)

10 20 30 40 50 60
 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MASLKAALSE EELEKKS KAI IEEYLHLNDM KEAVQCVQEL
 70 80 90 100 110 120
 ASPSLLFIFV RHGVESTLER SAIAREHMGQ LLHQLLCAGH LSTAQYYQGL YEILELAEDM
 130 140 150 160 170 180
 EIDIPHVWLY LAELVTPILQ EGGVPMGELF REITKPLRPL GKAASLLLEI LGLLCKSMGP
 190 200 210 220
 KKVGTWREA GLSWKEFLPE GQDIGAFVAE QKVEYTLG**YP YDVPDYA**

TAG	AS	M _w [kDa]	pI	Abs 0.1 % (= 1 g/l)	Extinktions- koeffizient
+	227	25.3	5.5	1.18	29910
-	210	23.5	4.9	1.27	29910

eIF4GMD (710-1076)

10 20 30 40 50 60
 GST-LEVLFO
 GPGSFRRVRS ILNKLTPQMF QQLMKQVTQL AIDTEERLKG VIDLIFEKAI SEPNFSVAYA
 70 80 90 100 110 120
 NMCRC LMALK VPTTEKPTVT VNFRLKLLNR CQKEFEKDKD DDEVFEKKQK EMDEAATAEE
 130 140 150 160 170 180
 RGRLKEELEEE ARDIARRRSL GNIKFIGELF KLKMLTEAMI HDCVVKLLKN HDEESLECLC
 190 200 210 220 230 240
 RLLTTIGKDL DFEKAKPRMD QYFNQMEKII KEKKTSSRIR FMLQDVLDLR GSNWVPRRGD
 250 260 270 280 290 300
 QGPKTIDQIH KEAEMEEHRE HIKVQQLMAK GSDKRRGGPP GPPISRGLPL VDDGGWNTVP

TAG	AS	M _w [kDa]	pI	Abs 0.1 % (= 1 g/l)	Extinktions- koeffizient
+	524	60.9	7.5	0.93	56840
-	300	34.9	8.7	0.40	13980

ScelF4A(20-395)

10 20 30 40 50 60
 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MVYKFDDMEL DENLLRGVFG YGFEEPSAIQ QRAIMPIIEG
 70 80 90 100 110 120
 HDVLAQAQSG TGKTGTFSIA ALQRIDTSVK APQALMLAPT RELALQIQKV VMALAFHMDI
 130 140 150 160 170 180
 KVHACIGGTS FVEDAEGLRD AQIVVGTPGR VFDNIQRRRF RTDKIKMFIL DEADEMLSSG
 190 200 210 220 230 240
 FKEQIYQIFT LLPPTTQVVL LSATMPNDVL EVTTKFMRNP VRILVKKDEL TLEGIKQFYV
 250 260 270 280 290 300
 NVEEEEYKYE CLTDLYDSIS VTQAVIFCNT RRKVEELTTK LRNDKFTVSA IYSDLPQQER
 310 320 330 340 350 360
 DTIMKEFRSG SSRILISTDL LARGIDVQQV SLVINYDLPA NKENYIHRIG RGGRFGRKGV
 370 380 390
 AINFVTNEDV GAMRELEKfy STQIEELPSD IATLLN

TAG	AS	M _w [kDa]	pI	Abs 0.1 % (= 1 g/l)	Extinktions- koeffizient
+	396	44.7	5.8	0.36	16390
-	379	42.8	5.3	0.38	16390

8.5 Report Primäres HTS-Screening eIF4A-myc:eIF4GICD-His



1

Assay Name: P_141121_UOKBaumann_SvantjeBorowski_4GCD

This document describes the sequential steps that were applied to select the list of primary actives that we suggest for subsequent analysis. Each section contains comments from the person that analyzed the data in bold/violet color font.

Delivered data package structure	
subfolder	content
analysis\<assay_name>	PrimaryScreeningReport.pdf (this file), PlateReports.pdf (graphical representation of the plate data), sampledata.txt (all numeric statistically analyzed data suitable for spreadsheets), primary_actives.sdf (structure data file containing the suggested compounds for cherry picking and further validation).
converter	contains .png files from quality checks during assay data collection
documents	contains the manually written protocol and project application forms
raw_data	contains .txt or .asc files containing the raw data as they come from the instruments

Step1: value type selection and removal of non-numeric results

Following value types were selected for analysis:

measurement_type	annotation
Label1_1_A1P	donor fluorescence
Label2_2_A1P	acceptor fluorescence
/({Label2_2_A1P;Label1_1_A1P})	acceptor/donor ratio

Of 16544 samples, 16 were found to contain non-numeric values and were discarded. 16528 samples have passed

Reasons for non-numeric values:

-> The PMT tube is set to a high voltage, slight increases in fluorescence may lead to overflow signals

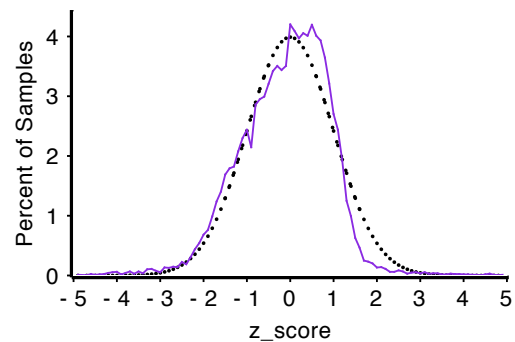
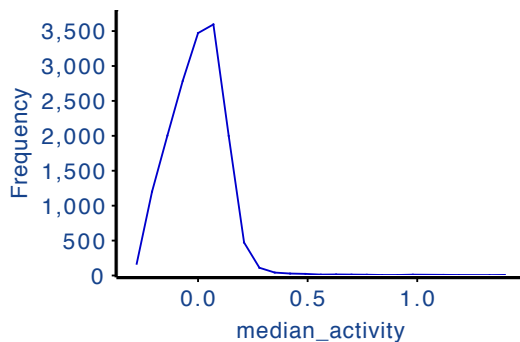


Assay Name: P_141121_UOKBaumann_SvantjeBorowski_4GCD

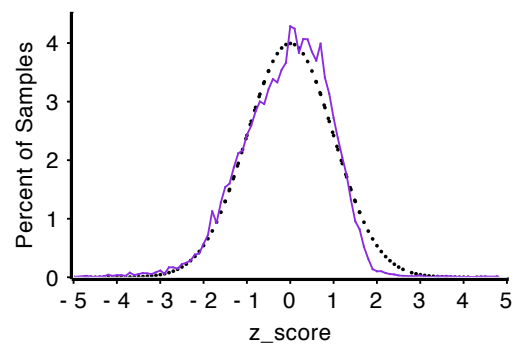
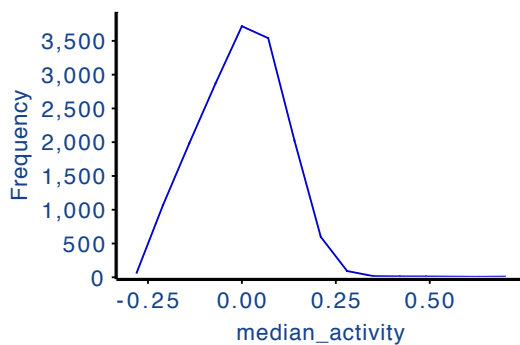
Step2: selection of valid measurements

For all samples on a plate and for all selected measurement types, the normalization properties "z_score" and "median_activity" are calculated (see appendix). To be able to define limits for identifying valid measurements, the median_activity and z_score distribution is plotted for each measurement type (the dotted line in the z_score distribution is the normal distribution reference), and the z-score correlation between the different measurement types are plotted.

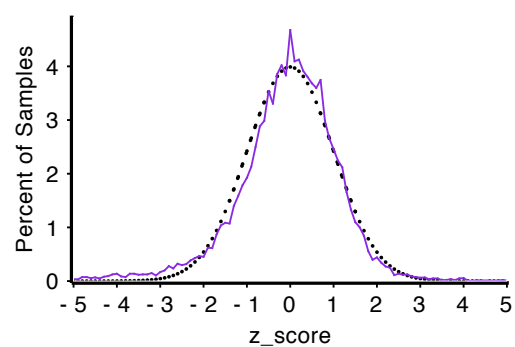
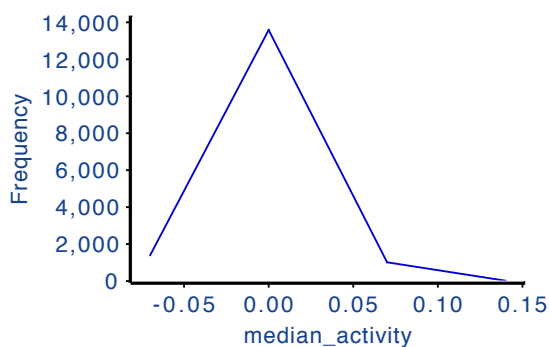
Measurement type: Label1_1_A1P,,



Measurement type: Label2_2_A1P,,

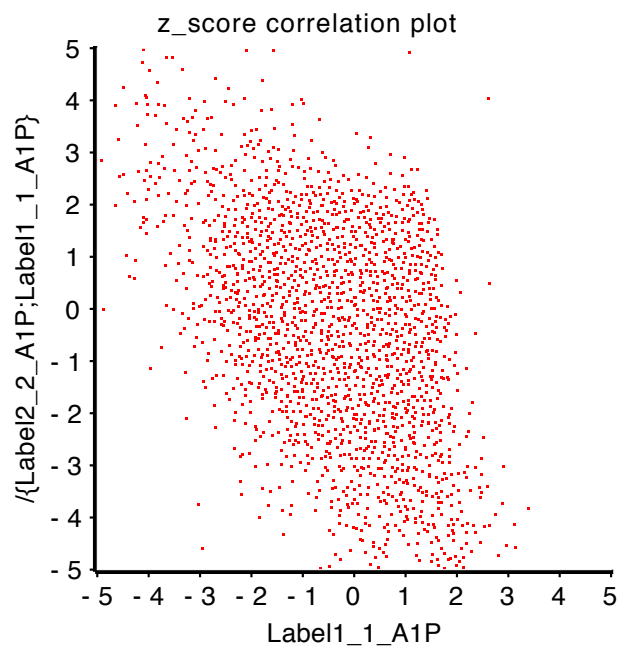
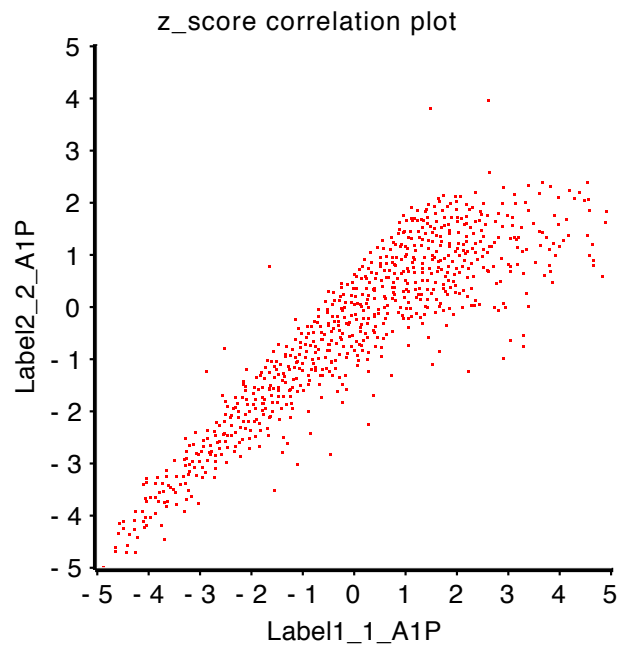


Measurement type: /(Label2_2_A1P;Label1_1_A1P),,



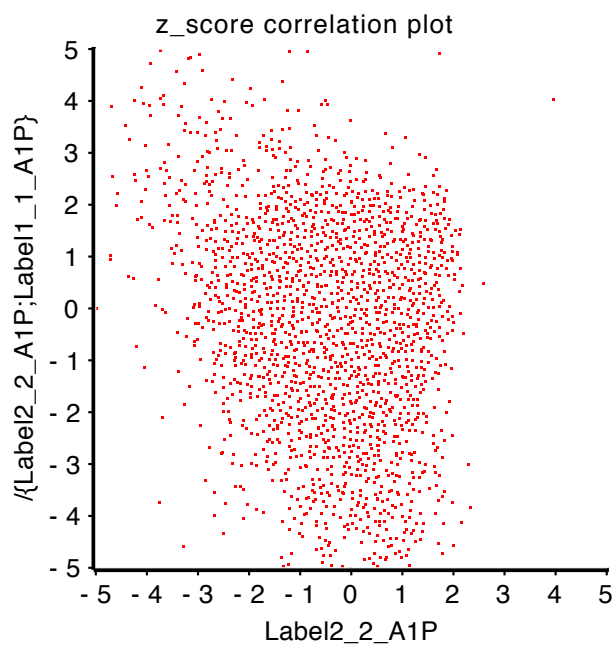
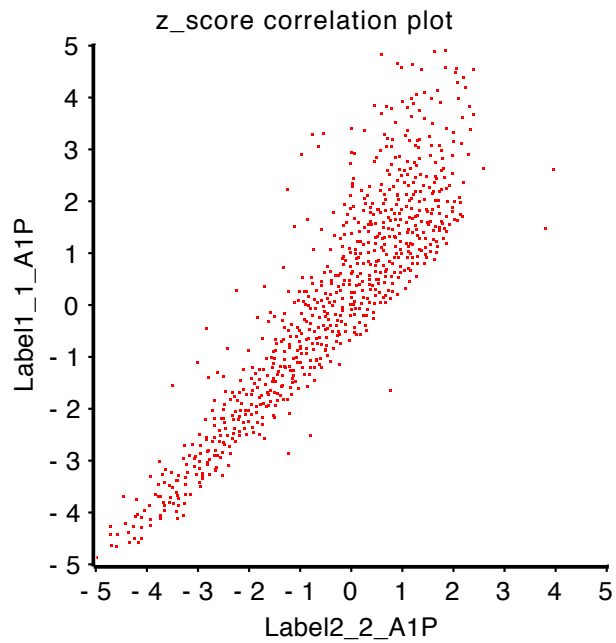


Assay Name: P_141121_UOKBaumann_SvantjeBorowski_4GCD



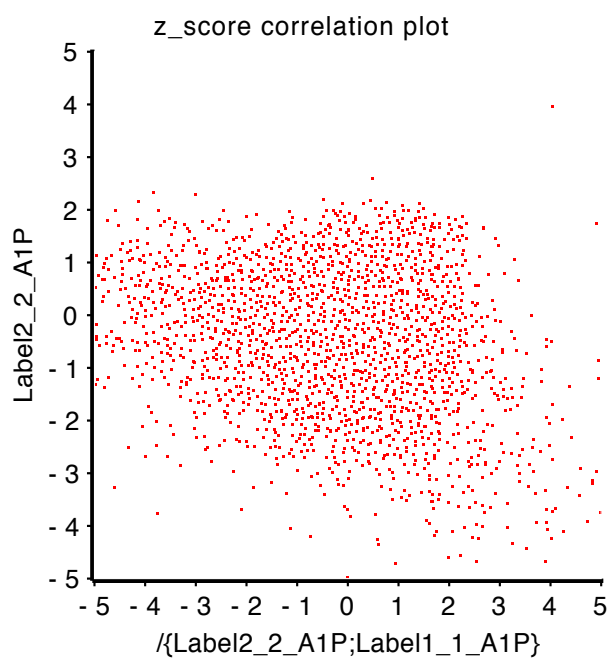
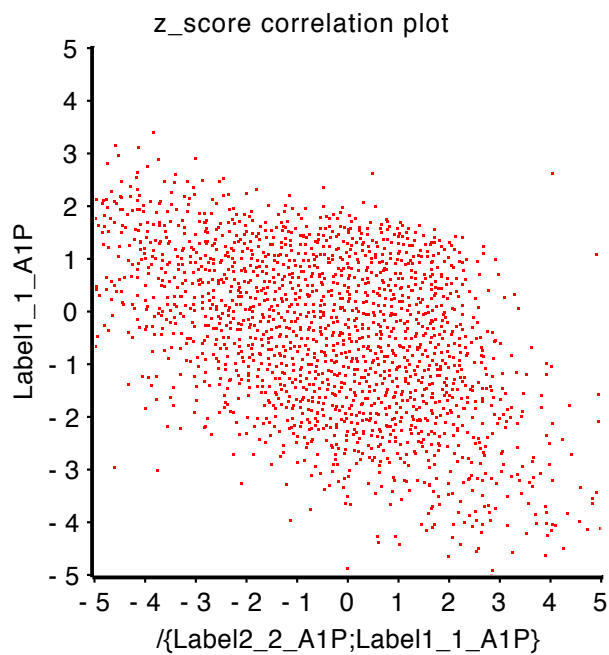


Assay Name: P_141121_UOKBaumann_SvantjeBorowski_4GCD





Assay Name: P_141121_UOKBaumann_SvantjeBorowski_4GCD



Correlation Matrix			
Property	Label1_1_A1P	Label2_2_A1P	/ {Label2_2_A1P;Label1_1_A1P}
Label1_1_A1P	1	0.88386	-0.61360
Label2_2_A1P	0.88386	1	-0.23803


Assay Name: P_141121_UOKBaumann_SvantjeBorowski_4GCD

/Label2_2_A1P;Label1_1_A1P}	-0.61360	-0.23803	1
-----------------------------	----------	----------	---

Reason for choosing specific limits for the selection of valid samples:

-> In the correlation plots samples with increased donor fluorescence are visible. Those should be removed, since the will lead to a decreased acceptor/donor ratio. As limit 4 standard deviations are used due to some tailing in the histogram.

Applied Filter Rules	
applied_filter	number_of_samples_failing
Label1_1_A1P: z_score<4	135
Label1_1_A1P: median_activity	0
Label2_2_A1P: z_score	0
Label2_2_A1P: median_activity	0
/Label2_2_A1P;Label1_1_A1P}: z_score	0
/Label2_2_A1P;Label1_1_A1P}: median_activity	0

Of 16528 samples, 16393 pass all of the filters defined above.

The z-scores, median-activity and control-based relative activities are re-calculated for the valid measurements.

Following measurement type was selected for statistic analysis: /Label2_2_A1P;Label1_1_A1P}


Assay Name: P_141121_UOKBaumann_SvantjeBorowski_4GCD
Step3: Summary of single plates analytics

Graphical representation of each plate data set is provided in the "PlateReports.pdf" file delivered together with this report. For the classification criteria of the z'-factors, see the literature references in the appendix.

Plate_ID	z_factor	z_factor_classification	accept
141208A1P2001	0.95	excellent	yes
141208A1P2002	0.91	excellent	yes
141208A1P2003	0.96	excellent	yes
141208A1P2004	0.97	excellent	yes
141201A1P2005	0.87	excellent	yes
141201A1P2006	0.87	excellent	yes
141208A1P2007	0.93	excellent	yes
141208A1P2008	0.93	excellent	yes
141208A1P2009	0.94	excellent	yes
141208A1P2010	0.94	excellent	yes
141201A1P2011	0.86	excellent	yes
141201A1P2012	0.90	excellent	yes
141201A1P2013	0.91	excellent	yes
141208A1P2014	0.94	excellent	yes
141201A1P2015	0.90	excellent	yes
141201A1P2016	0.89	excellent	yes
141201A1P2017	0.88	excellent	yes
141202A1P2018	0.96	excellent	yes
141202A1P2019	0.95	excellent	yes
141202A1P2020	0.91	excellent	yes
141202A1P2021	0.95	excellent	yes
141202A1P2022	0.97	excellent	yes
141202A1P2023	0.95	excellent	yes
141202A1P2024	0.97	excellent	yes
141202A1P2025	0.95	excellent	yes
141202A1P2026	0.93	excellent	yes
141202A1P2027	0.92	excellent	yes
141202A1P2028	0.95	excellent	yes
141202A1P2029	0.92	excellent	yes
141202A1P2030	0.93	excellent	yes
141202A1P2031	0.94	excellent	yes
141202A1P2032	0.95	excellent	yes
141202A1P2033	0.97	excellent	yes
141202A1P2034	0.96	excellent	yes
141202A1P2035	0.92	excellent	yes
141202A1P2036	0.96	excellent	yes
141202A1P2037	0.94	excellent	yes
141202A1P2038	0.94	excellent	yes
141208A1P2039	0.94	excellent	yes
141208A1P2040	0.92	excellent	yes
141208A1P2041	0.94	excellent	yes
141208A1P2042	0.92	excellent	yes
141208A1P2043	0.93	excellent	yes



Assay Name: P_141121_UOKBaumann_SvantjeBorowski_4GCD

141208A1P2044	0.95	excellent	yes
141208A1P2045	0.97	excellent	yes
141208A1P2046	0.92	excellent	yes
141208A1P2047	0.94	excellent	yes

Average Z'Factor: 0.93 ± 0.027

General comments about the plate data:

-> all plates show a very nice signal separation.

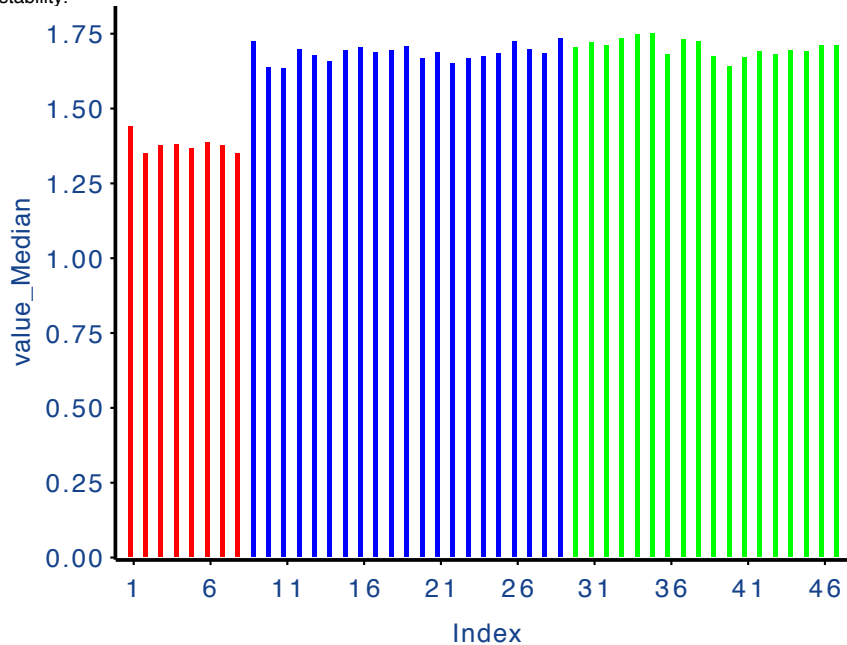
Of 47 plates, 47 were accepted.

Of 16393 samples, 16393 samples passed visual inspection of the plate data.

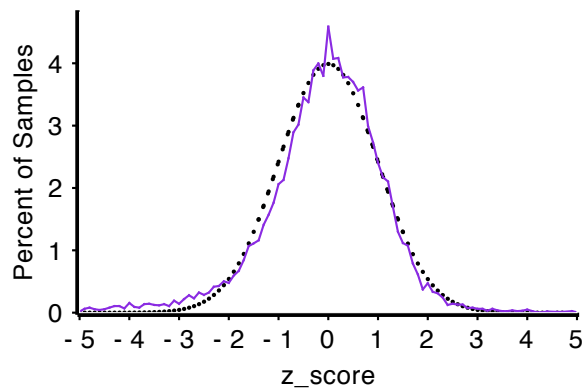
At this point, after visually checking the plausibility of the plate data, the "sampledata.txt" file containing the sample and control values and its normalized values is written. This file can be used for your own data mining purposes.

**Assay Name: P_141121_UOKBaumann_SvantjeBorowski_4GCD****Step4: Statistic analysis of valid numeric results**

The median of the sample signals on each plate are plotted against the sequence of plates (plates sorted by measurement time). A different color is used for each different measurement day. The plot shows trends for batch to batch variations and component stability.



The z-score distribution of the valid samples shows whether the systematic variations between plates could be removed by normalization and gives hints on where to set the filter limits for selection of actives based on z-score. The dotted line represents an ideal normal distribution for comparison

Distribution of z_score



Assay Name: P_141121_UOKBaumann_SvantjeBorowski_4GCD**Step5: Final selection of primary actives**

-> In the histogram there is a tailing visible towards lower z-scores, therefore we increase the hit limit from 3 to 4 standard deviations.

Applied Filter Rules	
applied_filter	number_of_samples_failing
/({Label2_2_A1P;Label1_1_A1P}): z_score<-4	16006
/({Label2_2_A1P;Label1_1_A1P}): median_activity	0
/({Label2_2_A1P;Label1_1_A1P}): rel_activ	0

Of 16393 samples, 16006 samples fail in at least one of the filters defined above, leaving 387 samples.

Then, the samples were sorted ascending by z_score and the top 352 and the bottom 0 samples were kept, giving the final list of 352 selected actives.

The chemical structures, normalized data and links to PubChem can be found in the file "primary_actives.sdf"



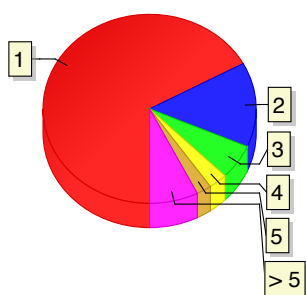
Assay Name: P_141121_UOKBaumann_SvantjeBorowski_4GCD

Step6: Characterisation of the primary actives list

The basic statistics table analyzes the normalised properties z_score, median_activities and control based relative activities. Use this table to check whether the final selection criteria where reasonable (especially sorting order)

basic statistics of the primary actives list	
Property	value
z_score_Mean	-6.80
z_score_Min	-21.50
z_score_Max	-4.20
median_activity_Mean	-0.15
median_activity_Min	-0.43
median_activity_Max	-0.07
rel_activ_Mean	0.82
rel_activ_Min	0.50
rel_activ_Max	0.91

Using Tanimoto similarity search (Tanimoto cut-off at 0.6 using the FCFP_4 Fingerprint, see references table at the end of this document), the number of related structures within the primary actives list is determined for each compound sample, and a summary saying how many compounds are in the list with how many related structures is displayed in the pie chart and its accompanying table. Since similar structure should lead to similar activities, appearance of structures with related structures is a sign for success of the screening process



NumberOfCompoundsThatHave	NumberOfRelatedStructures
236	1
51	2
21	3
10	4
8	5
26	>5

Summary and Outlook:

There appears an enrichment of related structures within the list of actives. Pick these 352 primary actives and proceed with IC50 determination. The average relative decrease in signal is rather low (20%), therefore the list contains many samples with low potency as well.

8.5.1 Counterscreen

FMP-205116

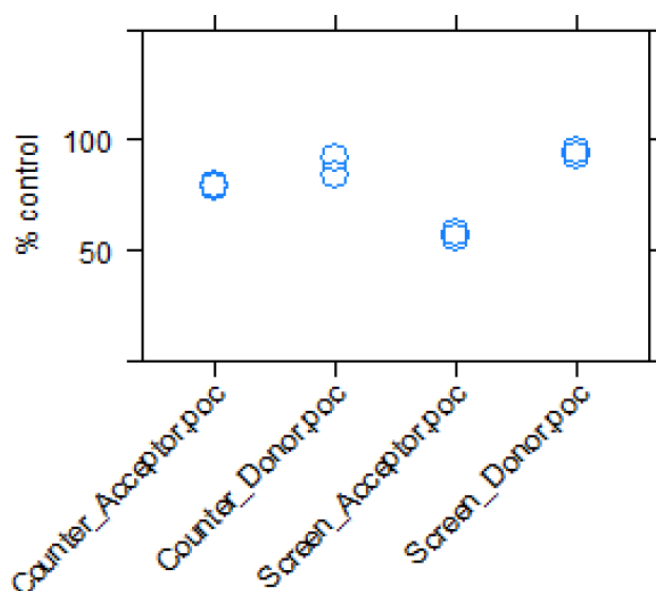


Abbildung 8.10: Counterscreen von 1-[(1R)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-1-yl]-N-[[2(trifluoromethyl)phenyl]methyl]methanamin.

Vergleich der Akzeptor Fluoreszenz und Donor Fluoreszenz von Counterscreen (His-eIF4A-Myc) gegen die Akzeptor Fluoreszenz und Donor Fluoreszenz HTR-FRET Assay.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildung-, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen- noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahren nicht vornehmen werde. Die Bestimmung dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorlegte Dissertation ist von Prof. Dr. U. Baumann betreut worden.

Swantje Borowski

(Swantje Heidi Borowski)

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Swantje, Heidi Borowski (geb. Zimmermann)
Geburtstag: 07. Juni 1984
Geburtsort: Karl-Marx-Stadt (Chemnitz)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet
Adresse: Neudorfer Straße 160,
47057 Duisburg

Schulische Ausbildung:

August 1990 - Juni 1995 Grundschole Borna in Chemnitz / Josefschule in Krefeld
August 1995 - Juni 1997 Kurt Tucholsky Gesamtschule in Krefeld
August 1997 - Juni 2002 Gymnasium Marienschule in Krefeld
August 2002 - Juni 2005 Berufskolleg Uerdingen in Krefeld (Gymnasiale Oberstufe)

Studium:

WS2005 Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Mathematische-
Naturwissenschaftliche Fakultät, Fachbereich Chemie,
Diplomstudiengang

SS2006/SS2008 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Mathematische-
Naturwissenschaftliche Fakultät, Fachbereich Biochemie,
Bachelor of Science

Bachelor-Arbeit: Versuche zur chemoenzymatischen Synthese von γ -Aminosäure

WS2008/SS2010 Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Mathematische-
Naturwissenschaftliche Fakultät, Fachbereich Biochemie,
Master of Science

Master-Arbeit: Stationäre und Kinetische Untersuchungen zur Assemblierung
des Phytochromes

Promotion:

SS2011/heute Universität zu Köln, Mathematische-Naturwissenschaftliche
Fakultät, Fachbereich Chemie, Institut für Biochemie, seit
SS2012 Mitglied des Graduiertenprogramms "Pharmacology
and Experimental Therapeutics"

Dissertation: Biochemische Untersuchungen an den eukaryotischen
Initiationsfaktoren 4A/4G

Swantje Borowski

Köln ,26.06.2015 Swantje, Heidi Borowski